

Versuche zur Radioimmunologischen Bestimmung von Ocytocin im Rinderplasma

von

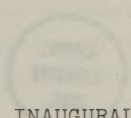
Volker Himmler

1977

AUS DEM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE
DER SUDD. VERSUCHS- UND FORSCHUNGSANSTALT
FÜR MILCHWIRTSCHAFT WEIHENSTEPHAN
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR. HEINRICH KARG

VERSUCHE ZUR RADIOIMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG
VON OCYTOCIN IM RINDERPLASMA



INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER
TIERMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
DES FACHBEREICHS TIERMEDIZIN
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

VON
VOLKER HIMMLER
AUS NORDRACH

MÜNCHEN 1977



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent:	Prof. Dr. H. Karg
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. H. Bostedt

Tag der Promotion: 25. Februar 1977

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
Abkürzungen	IV
Vorbemerkung	1
1. Literatur	2
1.1 Überblick über Entdeckung, Lokalisierung, Chemie und Stoffwechsel von Ocytocin	2
1.1.1 Entdeckung der Hinterlappenhormone ...	2
1.1.2 Chemische Eigenschaften des Ocytocins	2
1.1.3 Lokalisierung, Synthese und Frei- setzungsmechanismen von Ocytocin	4
1.1.4 Ocytocin und Neurophysin	6
1.1.5 Halbwertszeit, Verteilung im Körper und Ausscheidung	7
1.1.6 Ocytocinabbauende Enzyme	8
1.2 Physiologische Wirkungen von Ocytocin	9
1.2.1 Wirkungen auf die Mamma	9
1.2.1.1 Wirkungsmechanismus	9
1.2.1.2 Konzentrationen von Ocytocin im Plasma während des Melkens	10
1.2.2 Ocytocin und Geburt	12
1.2.3 Der neurohormonelle Reflex	13
1.2.4 Sonstige Wirkungen von Ocytocin	16
1.2.4.1 Wirkungen auf das Zyklus- geschehen	16
1.2.4.2 Wirkung auf den nicht tra- genden Uterus	17
1.2.5 Ocytocin beim männlichen Geschlecht ..	18
1.3 Meßverfahren für Ocytocin	19
1.3.1 Biologische Meßverfahren	19
1.3.1.1 Methode von Bisset et al. (1967)	20
1.3.1.2 Test von Van Dongen und Hays (1966)	22

	Seite
1.3.1.3 Test von Rydén und Sjöholm (1962)	23
1.3.2 Radioimmunologisches Meßverfahren.	23
1.3.2.1 Radioimmunotest (RIT) allgemein	23
1.3.2.2 Radioimmunotest Ocytocin .	24
2. Material und Methoden	27
2.1 Wichtigste Reagenzien und spezielles Labormaterial	27
2.2 Immunisierung	28
2.2.1 Immunisierung mit nicht gekoppeltem Ocytocin	29
2.2.1.1 Injektion bei der ersten Applikation direkt in die Lymphknoten	29
2.2.1.2 Injektion in ca. 50 Stellen im Nackenbereich	31
2.2.2 Konjugation von Ocytocin an Human- serumalbumin und an Thyreoglobulin	31
2.2.3 Schema der Immunisierung	33
2.3 Markierung	33
2.3.1 Chloramin T-Methode	34
2.3.2 Enzymatische Markierung	35
2.3.3 Elektrische Markierung	36
2.4 Inkubation: Volumen, Dauer, Temperatur .	37
2.4.1 Volumen	37
2.4.2 Inkubationsdauer und Temperatur ..	38
2.5 Trennverfahren	38
2.5.1 Ammoniumsulfatmethode	38
2.5.2 Doppelantikörpermethode	39
2.6 Extraktionsverfahren	40
2.6.1 Spherosil	41
2.6.2 Lösungsmittel	42
2.7 Auswertung der Zählraten	42
2.8 Vorgehen bei Tastversuchen	47

	Seite
3. Ergebnisse	50
3.1 Antisera	50
3.1.1 Kopplung von Ocytocin an Humanserum- albumin (HSA) und Thyreoglobulin (TG)	50
3.1.2 Immunisierung	50
3.2 Markierung	53
3.2.1 Markierung mit Chloramin T	53
3.2.2 Markierung mit Laktoperoxydase	55
3.2.3 Elektrische Markierung	56
3.3 Inkubation	57
3.3.1 Temperatur	57
3.3.2 Inkubationszeit	59
3.4 Trennverfahren	62
3.5 Extraktion	65
3.5.1 Spherosil (Wiederfindung von mark. Hormon, im RIT und im Biotest).....	65
3.5.2 Andere Adsorbentien	70
3.5.3 Extraktion mit Methanol	70
3.5.4 Extraktionsversuche mit Aceton	73
3.6 Erstellen von Standardkurven von Ocytocin, Kreuzreaktionen mit anderen Peptid- hormonen	76
3.6.1 Antiserum Ocy 1	76
3.6.2 Antiserum Olaf 3	76
3.7 Auswertung von Tests mit dem Kleincom- puter, Vergleich mit anderen Methoden	82
3.8 Tastversuche	87
4. Diskussion	90
5. Zusammenfassung	97
6. Literaturverzeichnis	99
Lebenslauf	126

A b k ü r z u n g e n

AVP	Argininvasopressin
CPM	Impulse pro Minute (counts per minute)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HHL	Hypophysenhinterlappen
HSA	Humanserumalbumin
I.U. bzw. mU oder μ U	Internationale Einheit bzw. Teile davon
LH	Luteinisierungshormon
LVP	Lysinvasopressin
NSO	Nucleus supraopticus
NPV	Nucleus paraventricularis
RIT	Radioimmunotest
TG	Thyreoglobulin

Markennamen sind nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet, auch wenn es sich um geschützte Namen handelt.

V o r b e m e r k u n g

Im Zeitalter der Biotechnik wird es immer schwieriger, einen annehmbaren Kompromiß zwischen den Anforderungen des Menschen an Arbeitserleichterung und Freizeitgewinn und den physiologischen Ansprüchen, welche das von der Technik betroffene Tier stellt, zu finden.

Die Schwierigkeiten liegen häufig darin begründet, daß es an geeigneten Parametern fehlt, um zu erkennen, wo die Grenze vom physiologischen zum unphysiologischen Bereich liegt. Das Maß der aktuellen Leistung eines Tieres mag hierzu als Anhaltspunkt dienen, reicht aber sicher nicht für langfristige Beurteilungen aus.

Im Bereich der Melktechnik bietet es sich an, den Milchejektionsreflex bzw. die durch ihn verursachte Oxytocin-freisetzung als einen physiologischen Parameter heranzuziehen. Dazu ist es zuerst notwendig, die Konzentrationen dieses Hormons im Blut bestimmen zu können und die Werte in ihrer Bedeutung als Parameter zu überprüfen. Zahlreiche Proben müssen dazu untersucht werden. Es ist also die Etablierung eines leistungsfähigen Testsystems erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit war es meine Aufgabe, Entwicklungsarbeiten zu leisten, die an dieses Ziel heranzuführen.

1. L i t e r a t u r

1.1 Überblick über Entdeckung, Lokalisierung, Chemie und Stoffwechsel von Ocytocin*

1.1.1 Entdeckung der Hinterlappenhormone

1895 entdeckten Oliver und Schäfer, daß Extrakte, welche sie aus Hinterlappen der Hypophyse gewonnen hatten, blutdruckerhöhend wirkten. Elf Jahre später fand Dale (1906) heraus, daß diese Extrakte Kontraktionen der Uterusmuskulatur verursachen; Bell und Hick bestätigten diese Befunde 1909. Die Milchejektion bei Ziegen als Folge intravenöser Applikation eines Hinterlappenausguges beschrieben Ott und Scott 1910.

1.1.2 Chemische Eigenschaften des Ocytocins

Bereits im Jahr 1926 äußerte Thorpe die Vermutung, daß es sich bei den aus der Neurohypophyse stammenden aktiven Substanzen um Peptide handeln könne. Kamm et al. (1928) gelang dann die Auftrennung der beiden verschieden wirkenden Komponenten (Ocytocin und Vasopressin), Stehle und Fraser wiesen 1935 erstmals Aminosäuren als Bestandteile der Hormone nach. 1953 gelang du Vigneaud et al. und fast gleichzeitig Tuppy (1953) und Tuppy und Michl (1953) die Aufklärung der Aminosäuresequenz. Beide Arbeitsgruppen schlugen unabhängig voneinander die in Abb. 1 gezeigte Strukturformel vor.

* Die Schreibweise "Ocytocin" wurde nach dem Vorschlag Karlson's (1967) gewählt und entspricht den in "The Nomenclature of peptide hormones" (1975) gemachten Empfehlungen. Im Abschnitt 6. (Literaturverzeichnis) wurde die von den Autoren gewählte Schreibweise wiedergegeben.

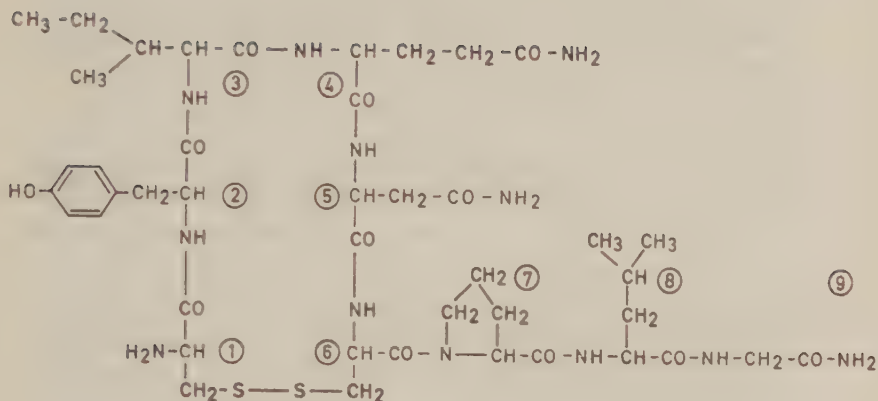


Abb. 1: Strukturformel des Oxytocins
(nach Bargmann, 1968)

Du Vigneaud et al. gelang dann im Jahr 1954 mit der ersten Peptidsynthese überhaupt die Synthese des Oxytocins. Wie aus der Abb. 1 zu ersehen ist, handelt es sich um ein aus 9 Aminosäuren aufgebautes Molekül. Die in Position 1 und 6 befindlichen Cysteine werden zu einem Cystin verknüpft und stellen so die Ringstruktur des Hormons her. Autoren, welche von der Anzahl der für die Synthese notwendigen Aminosäuren ausgehen, sprechen das Hormon folglich als Nonapeptid, andere, die das Cystin als Einheit ansehen, demnach als Oktapeptid an.

Das Ocytocin bildet mit Säuren Salze, der isoelektrische Punkt liegt bei ph 7,7; das Molekulargewicht ist 1007 (Boissonnas und Guttman 1968, Döcke 1975). Die Aufbewahrung erfolgt am günstigsten bei ph 3,0 in wässrigen Lösungen (Adamson et al. 1958). Über die Raumstruktur liegen vom Ocytocin und einigen Derivaten Untersuchungen vor (u.a. Brewster et al. 1973).

Beim Säuger wurde Ocytocin bei den bis heute untersuchten Spezies nur in einer Form gefunden (Acher 1962, Lederis 1961), im Gegensatz zum Vasopressin, wo zwei unterschiedliche Formen gefunden wurden, Lysin-Vasopressin und Arginin-Vasopressin. Die geringsten, künstlichen Veränderungen am Ocytocinmolekül beeinflussen die biologische Wirksamkeit des Hormons außerordentlich. Boissonnas und Guttman (1968) erklären die hohe Spezifität mit der igelartigen Raumstruktur des Ocytocinmoleküls.

1.1.3 Lokalisierung, Synthese und Freisetzungsmechanismen von Ocytocin.

Der Hypophysenhinterlappen (HHL), auch als Neurohypophyse bezeichnet, entstammt embryonal dem Zwischenhirnboden (Grau, Walter 1967). Es wird heute allgemein anerkannt, daß der HHL als Speicherorgan der in den Nervenzellen des Hypothalamus produzierten Peptidhormone dient (Sawer 1961). Er liegt bei den einzelnen Tieren unterschiedlich dorsal bis caudal der Adenohypophyse und ist - wiederum unterschiedlich bei den einzelnen Tierarten - von der Adenohypophyse durch die Pars intermedia getrennt.

Die Verbindung zwischen den im Hypothalamus gelegenen Kerngebieten der Nervenzellen, dem Nucleus paraventricularis (NPV) und dem Nucleus supraopticus (NSO) und dem HHL wird als Infundibulum bezeichnet (Bargmann 1968).

Die Biosynthese des Ocytocins und auch des eng verwandten Vasopressins findet im NPV und NSO statt. Bindler et al. (1967) zeigten durch Untersuchungen an isolierten Nervenendigungen vom Rind, daß die einzelne Zelle entweder Ocytocin oder Vasopressin produziert. Neuere enzym-histochemische Untersuchungen (Weindl pers. Mitteilung) zeigten diese Differenzierung auch in den Kerngebieten des Hypothalamus, die Untersuchungen von Vandesande et al. erweitern diesen Befund auch auf die Neurophysine I+II (1975).

Die Verteilung der das jeweilige Hormon produzierenden Zellen zwischen den einzelnen Kerngebieten schwankt bei den einzelnen Tierarten, jedoch überwiegt im NPV immer die Produktion von Ocytocin. In Einzeluntersuchungen beim Kaninchen (Aulsebrook und Holland, 1969a) und beim Schaf (Lederis 1961) konnte Vasopressin im NPV überhaupt nicht nachgewiesen werden.

Das Ocytocin wandert (ebenso wie das Vasopressin) innerhalb der Ausläufer der zum HHL reichenden Nervenzellen im Axonplasma (Weiß 1961), wird dann in der Neurohypophyse gespeichert und von hier auf adäquate Reize hin freigesetzt (Bargmann und Scharrer 1951). Für das Vasopressin ist bekannt, daß die Freisetzung von der extracellulären Ca^{2+} - Konzentration abhängig und mit Ca^{2+} - Aufnahme in der Zelle verbunden ist (Douglas und Poisner 1964 a/b). In der Nervenzelle befinden sich Ocytocin und Vasopressin in Organellen, den neurosekretorischen Körnchen, die auf eine Veränderung des Aktionspotentials - vermutlich durch Exocytose (= ohne Membranverlust) (Dreifuss et al. 1973) - aus dem HHL freigesetzt werden. Da dieser Mechanismus dem cholinergen und adrenergen Nerven sehr ähnlich ist, schlugen Bargmann et al. (1967) den Begriff "peptiderge Neuronen" vor.

1.1.4 Ocytocin und Neurophysin

1942 isolierten Van Dyke et al. aus HHL von Rindern einen Proteinkomplex, welcher sowohl die Eigenschaften von Ocytocin als auch von Vasopressin zu haben schien. Weitere Untersuchungen (Acher et al. 1956, Acher und Fromageaut 1957) ergaben, daß die Peptidhormone von diesem Protein abzutrennen sind, der Proteinkomplex verliert damit die Eigenschaften der Peptide.

Das ursprünglich als "Van Dyke-Protein" angesprochene Eiweiß konnte inzwischen bei zahlreichen Tieren und beim Menschen nachgewiesen werden (Acher et al. 1965, Pickering 1968, Hollenberg und Hope 1968, Watkins und Ellis 1972, McNeilly et al. 1972 und Watkins 1973, Legros und Lois 1973/74). Die Angaben für das Molekulargewicht schwanken zwischen 8000 und 20000.

Sawyer (1961) spricht die heute als Neurophysin I+II bezeichneten Proteine als Trägerproteine an. Daneben gewinnt die von Sachs und Tabatabake (1964) aufgestellte Theorie durch Untersuchungen von Fabert et al. (1973) wieder an Boden, daß die Neurophysine nur gemeinsam mit den Peptidhormonen produziert würden, also einen gemeinsamen "Precursor" haben. Sie begründen dies durch das im Hypothalamus nachgewiesene molare Konzentrationsverhältnis von Neurophysin zu Ocytocin von 1,0 : 1,4, während in der Neurohypophyse dieses Verhältnis 1 : 10 ist. Sie führen weiterhin die von Walter et al. (1971) und Capra et al. (1972) beschriebenen Sequenzanalysen als Beweis der "Precursor"-Theorie an; demnach sei es sehr wahrscheinlich, daß beiden Molekülen aufgrund der teilweise identischen Struktur ein und dasselbe Gen zugrunde liege.

1.1.5 Halbwertszeit, Verteilung im Körper und Ausscheidung

Die biologische Halbwertszeit exogen zugeführten Ocytocins wird für das Rind mit 2,1 Min (Cleverly und Folley, 1970), 1,03 Min (Parkash und Anderson 1972) und 0,65 Min (Barowitz und Ewy, 1973) angegeben. Ähnlich kurze Zeiten werden auch für andere Spezies berichtet, so für die Ratte mit 1,65 Min (Ginsburg und Smith, 1959); Sjöholm und Ryden (1967) fanden ebenfalls für die Ratte Halbwertszeiten zwischen 1,2 und 1,6 Min (ermittelt durch Injektion von markiertem Ocytocin. Die Angaben für den Menschen sind 2,7 Min (González-Panizza et al., 1961). Rydén und Sjöholm (1969) zeigten, daß die Halbwertszeit bei der Frau von den Sexualhormonen beeinflusst wird. Dominieren die Östrogene, nimmt die Halbwertszeit zu, Gestagene bewirken das Gegenteil.

Ausführliche Verteilungsstudien über Ocytocin liegen aus Rattenversuchen vor (Ginsburg und Smith, 1959, Sjöholm und Ryden, 1969, Fabian et al., 1969). Es ergibt sich daraus folgendes Bild:

Die Verteilung von radioaktiv markiertem Ocytocin über das Blut erfolgt rasch; Niere und Uterus nehmen rasch Ocytocin aus dem Blut auf. Der Uterus gibt das Hormon oder Metaboliten dann sehr schnell wieder ab. Bei laktierenden Tieren scheint auch die Mamma an der Verteilung im Körper und der Ausscheidung beteiligt. Eine Unterbindung der Nierengefäße, sowie der Gefäße im Splanchnikusbereich verlängert die Halbwertszeit erheblich, auch bei laktierenden Tieren, und zwar um 2 - 4 Minuten.

Die Ausscheidung aus der Niere in den Urin erfolgt innerhalb kürzester Zeit, so konnten nach Gabe von radioaktiv markiertem Ocytocin nach 1 Stunde bereits 30 - 45 % der

gesamten Aktivität wieder gefunden werden. Die weitere Untersuchung ergab, daß etwa die Hälfte des Ocytocins im Urin in inaktiver Form vorlag, das in Pos. 9 (Abb. 1) befindliche Glycin war abgespalten.

1.1.6 Ocytocinabbauende Enzyme

Als erster berichtete Fekete 1930 vom Vorhandensein eines spezifischen Ocytocin abbauenden Agens im Serum schwangerer Frauen. Werle und Effkemann zeigten 1941, daß es sich um einen enzymatischen Effekt handelt. Das als Ocytocinase bezeichnete Enzym wurde in der Folgezeit mehrfach untersucht. Es handelt sich um ein Metallprotein (Tuppy und Nesvadba, 1957), das Molekulargewicht liegt bei 300.000 (Yman und Sjöholm, 1967).

Man findet das Enzym beim Menschen und beim Rhesusaffen während der Schwangerschaft bzw. der Trächtigkeit. Bei anderen Säugern wurde eine spezifische Ocytocinase nicht nachgewiesen (Tuppy 1968). Speziell für das Rind fand Winkhaus (1954) zu keiner Zeit ocytocinabbauende Enzyme im Plasma. Er verweist allerdings darauf, daß in den Erythrocyten ein ocytocinabbauendes Ferment enthalten ist, welches bei deren Zerstörung, bei Hämolyse, frei wird und Ocytocin inaktiviert. In den Geweben sind ebenfalls ocytocinabbauende Enzyme nachgewiesen worden: Leber, Niere, Pankreas, Skelettmuskel, Milz, Uterus, Milchdrüse und Dünndarm des Rindes enthalten ocytocinabbauende Enzyme (Suska-Brezinska et al. 1965). Nierengewebe und Gehirngewebe der Ratte (Marks et al. 1973, Walter und Shlank 1975) inaktivieren ebenfalls Ocytocin. Auch Gewebehomogenate von Hühnern wirken ocytocinabbauend (Brzezinska-Slebodzinska 1974).

1.2 Physiologische Wirkungen von Ocytocin

1.2.1 Wirkungen auf die Mamma

1.2.1.1 Wirkungsmechanismus

Ott und Scott hatten 1910 die Wirkung von HHL-Extrakten auf die Milchabgabe von Ziegen beobachtet. Gaines stellte (1915) die These auf, daß es sich um einen Aktivierungsprozeß im Euter handelt und nicht um eine direkte Wirkung auf die Milchbildung.

1949 waren dann durch eine von Richardson entwickelte spezielle Färbetechnik die Myoepithelzellen, die die sezernierenden Alveolen umschließen, sichtbar gemacht worden; in den folgenden Jahren untersuchte Linzell (1955, 1959) Milchdrüsen verschiedener Tiere. Er beschreibt die Myoepithelzellen als "ideal angeordnet für die Entleerung der Milch aus den Alveolen". Daß die Reaktion spezifisch für Ocytocin ist, wiesen Wakerly et al. (1973) nach, indem sie zeigen konnten, daß Acetylcholin zwar bei der Ratte Milchejektion hervorrufen kann, daß aber die eigentliche ocytocinartige Wirkung nur durch einen spezifischen Ocytocinhemmer unterbunden werden kann.

Als Rezeptoren für das Ocytocin sind nach Soloff et al. (1972/1974) sowie Soloff und Swarts (1973/1974) Proteine anzusehen bzw. sind an der Rezeptorstruktur zumindest Proteine beteiligt. Zu dem oben angesprochenen Angriffspunkt des Ocytocins an den Myoepithelien stellt Ollivier-Bousquet (1976) eine weitere Wirkung auf die sezernierende Zelle bzw. die Zellorganellen fest; sie kommt aufgrund ihrer Arbeiten zu dem Schluß, daß dem Ocytocin eine den Zellstoffwechsel fördernde Eigenschaft zuzuordnen sei.

1.2.1.2 Konzentrationen von Ocytocin im Plasma während des Melkens

Die heute bekannten Angaben über die im Blut zirkulierenden Konzentrationen von Ocytocin sind nach Cowie und Tindal (1971) vorsichtig zu beurteilen, da die Präzision einzelner Tests, welche zur Ermittlung der Daten verwendet wurden, sehr mangelhaft gewesen sei. Viele Autoren umgehen ohnehin den Terminus Ocytocin und umschreiben die gefundenen Meßwerte mit "ocytocinartiger Aktivität" (z.B. Randy et al. 1972). Im folgenden werden alle Werte als Ocytocin angegeben, auch wenn die Autoren eine Umschreibung der im Test gefundenen Werte benutzten.

Cleverly und Folley (1970) geben für das Rind Konzentrationen zwischen 9 und 898 $\mu\text{U/ml}$ Plasma aus der Vena jugularis während des Maschinenmelkens an, wobei bei 24 Untersuchungen 7 x Ocytocin nicht gemessen werden konnte (6,25 $\mu\text{U/ml}$ waren noch meßbar). Mommongan und Schmidt (1970) fanden Höchstwerte von 178 $\mu\text{U/ml}$ 1 Minute nach Ansetzen der Zitzenbecher. Wesentlich höhere Konzentrationen beschreiben Folley und Knaggs (1966) und Parkash und Anderson (1972). Sie berichten von Konzentrationen bis zu 2000 $\mu\text{U/ml}$ Plasma, auch hier wird von Melkzeiten berichtet, während derer Ocytocin nicht gemessen werden konnte.

Wesentlich höhere Werte sind von Lawson und Graf (1968) sowie Brandsma (1970) beschrieben worden, die bis zu 6400 $\mu\text{U/ml}$ Plasma bzw. 4800 $\mu\text{U/ml}$ Plasma fanden.

Die einzige Untersuchung über die Ocytocinkonzentration, die während des Melkens mittels eines Radioimmunotestes durchgeführt wurde (Forsling et al. 1974), erbrachte Höchstwerte von knapp 50 $\mu\text{U/ml}$ Plasma. In dieser Unter-

suchung wurde, allerdings nur bei 3 Tieren, immer eine Freisetzung von Ocytocin beobachtet. Bei diesen Untersuchungen wurde die von Cleverly und Folley (1970) für das Rind vermutete "intermittierende Freisetzung" bestätigt.

Eine Sonderstellung scheinen nach den bisher vorliegenden Untersuchungen Schaf und Ziege einzunehmen. Die kleinen Wiederkäuer setzen während des Melkens zwar ebenso Ocytocin frei wie die übrigen Tiere, die Nichtfreisetzung hat jedoch keinen Einfluß auf die Abgabe der Milch während des Melkens oder Saugens; sie tritt zudem wesentlich häufiger auf als bei Kühen: nur 32 % der untersuchten Melk- bzw. Saugakte, die von Folley und Knaggs (1966) untersucht wurden, führten zu Ocytocinfreisetzung; McNeilly (1972) fand positive Werte in ca. 60 % der Fälle, die gefundene Maximalkonzentration lag bei 105 $\mu\text{U/ml}$ Plasma.

Für das Pferd liegt nur eine Untersuchung über die Freisetzung von Ocytocin vor. Sharma (1974) fand hier Maximalwerte von 1000 $\mu\text{U/ml}$ Plasma; der geringste Gipfelwert lag knapp über 100 $\mu\text{U/ml}$ Plasma. Ob umgekehrt das Ocytocin unbedingt für die Milchejektion erforderlich ist, das heißt, ob eine Blockierung der Myoepithelzellen einen Einfluß auf die Milchabgabe hat, wurde für das Pferd nicht untersucht.

Unbedingt erforderlich erscheint Ocytocin für die Milchabgabe beim Schwein zu sein (Folley und Knaggs 1966). Die Autoren haben in ihren Untersuchungen zwar die Gewichtszunahme der Jungen nicht kontrolliert, aber sie ziehen aufgrund ihrer Beobachtungen doch den Schluß, daß in den Fällen, in denen Ocytocin nicht freigesetzt wurde, auch keine Milchabgabe an die saugenden Jungen erfolgte.

Die Rolle des Ocytocins ist bei den Laboratoriumstieren etwas schwierig zu untersuchen, da hier nicht genügend Blut für Verlaufsuntersuchungen zur Verfügung steht.

Cross (1966) gibt für das Kaninchen eine Freisetzung von 50 mU pro Saugakt an. Mit einem sehr empfindlichen Bioassay konnten Bisset et al. (1967) Konzentrationen bis zu 375 μ U/ml Plasma während des Saugens feststellen.

Für die Ratte berechneten Lincoln et al. (1973), daß ca. 1 mU während einer Saugphase ins Blut abgegeben werden.

Sehr genaue Untersuchungen liegen für den Menschen vor (Coch et al. 1968). Während des Saugens zirkulieren 12 - 25 μ U/ml Plasma. Die älteren Angaben von Hawker et al. (1961), welche keine Ocytocinfreisetzung feststellen konnten, sind wohl unter dem Gesichtspunkt der kritischen Bemerkung von Cowie und Tindal (s.o.) als nicht mehr relevant anzusehen.

1.2.2 Ocytocin und Geburt

Ein weiteres Phänomen, während dem Ocytocin freigesetzt wird, ist die Geburt. Sehr bald nach der Entdeckung der Hinterlappenextrakte wurde von Bell und Hick (1909) die Wirkung auf den Uterus beschrieben; auch der Vorschlag einer Ocytocin-Therapie bei Wehenschwäche erfolgte in jener Zeit (Bell 1909).

Eine Übersicht der bis zum Jahr 1966 gefundenen Daten über das während der Geburt freigesetzte Ocytocin geben Fitzpatrick und Walmsley (1966).

Bei Schaf, Kuh, Pferd und auch der Ziege (Folley und Knaggs 1965) steigen die Plasmakonzentrationen während der 2. Phase der Geburt, der Austreibungsphase, auf ca. 1000 μ U Ocytocin pro ml Plasma an. Ausnahme ist der Mensch mit etwa 200 - 400 μ U/ml; das Blut stammte jedoch nicht aus der Vena jugularis, sondern aus der Vena antebrachii. Mit dem Radioimmunotest fand Chard (1972) während der Austreibungsphase in der Nabelvene Werte um 15 - 20 μ U/ml Plasma; dies definiert er als Ocytocinanteil der maternalen Hypophyse. Er findet zudem den schon bei der Milchejektion beschriebenen "spurt-release" und weist eine Beteiligung der fötalen Hypophyse nach; in der Nabelarterie fand er etwa doppelt so hohe Ocytocin-Konzentrationen wie in der Nabelvene.

Welche Bedeutung die Ocytocinfreisetzung für den Geburtsablauf hat ist nach Fitzpatrick und Walmsley (1966) nicht eindeutig; beim Tier sei es unter Umständen für den Fötus lebensnotwendig, daß die Austreibungsphase rasch abgeschlossen wird, da die Nabelschnur sehr früh getrennt werden kann. Es könnte sich aber auch um ein zufällig auftretendes Phänomen handeln. Flint et al. (1975) wiesen jüngst einen Zusammenhang zwischen der Ocytocinfreisetzung und einem darauf folgenden Konzentrationsanstieg von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in der Utero-Ovarvene nach. Ob dieser beim Schaf gefundene Befund allgemein gültig ist und ob ihm weitere Bedeutung zukommt, bleibt offen. Dies vor allem deshalb, da Burton et al. (1974) beim Meerschweinchen nachweisen konnten, daß Ocytocin die Plazenta in jeder Richtung passieren kann.

1.2.3 Der neurohormonelle Reflex

Bei den oben angeführten Befunden über Ocytocinfreisetzung wurde der Mechanismus der Freisetzung nicht berücksichtigt. Seit den Arbeiten von Ely und Peterson (1941) über die

Zusammenhänge bei der Milchejektion und der aus dem gleichen Jahr stammenden Arbeit von Ferguson (1941), welche die Oxytocinfreisetzung nach Reizung des weiblichen Genitalbereiches betraf, ist bekannt, daß die Freisetzung von Oxytocin auf afferente Nervenimpulse hin erfolgt. Daß hier ein Zusammenhang besteht, ist bei einigen Naturvölkern empirisch. So kennt man Berichte, daß das Kalb an einer Seite der Kuh saugen durfte, damit auf der anderen Milch ermolken werden konnte. Andere versuchten, die Milchejektion durch Luftinsufflation in die Vagina zu provozieren (Parau 1975).

Der Vorgang während des Melkens oder Saugens stellt sich aus heutiger Sicht schematisch folgendermaßen dar (Abb. 2):

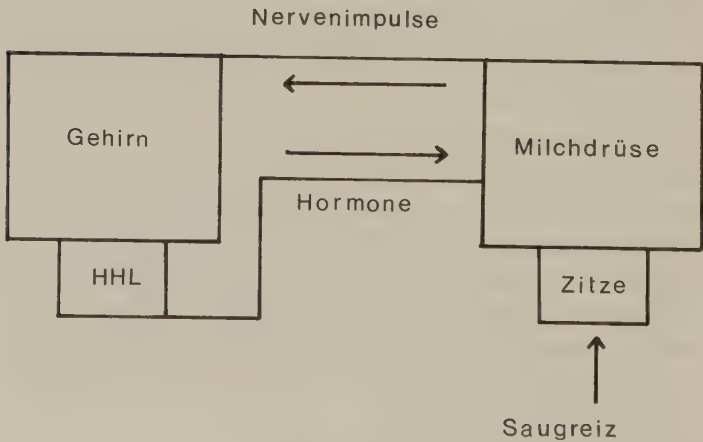


Abb. 2: Diagramm zur Veranschaulichung der Beziehungen zwischen Mamma und Gehirn (nach Tindal und Knaggs 1970)

Nach den grundlegenden Untersuchungen von Linzell (1959) über die Verteilung der Nerven im Euter von Schaf und Ziege, verfolgte Richard (1970/72) die afferenten Bahnen im Rückenmark des Schafes bis zum HHL. Bei Ziegen untersuchten dies Knaggs, McNeilly und Tindal (1972), den beim Meerschweinchen gefundenen Verlauf haben Tindal und Knaggs 1971 veröffentlicht, nachdem Tindal et al. (1969) über die beim Kaninchen gefundenen Ergebnisse berichtet hatten.

Faßt man die bei den einzelnen Spezies gefundenen Ergebnisse zu einem einheitlichen Bild zusammen, so gilt folgendes: Vom Euter kommend ziehen die afferenten Bahnen über N. spermaticus externus und N. perinealis zum Rückenmark, wo sie im dorsolateralen Bereich zu finden sind, von dort zum Gehirn. Im Mesencephalon verlaufen die Bahnen im seitlichen Tegmentum, um sich im Diencephalon in eine dorsale und eine ventrale Bahn auf jeder Seite aufzuspalten. Die ventrale dieser Bahnen scheint die für die Ocytocinfreisetzung verantwortliche Bahn zu sein, während die dorsale in die ebenfalls durch den Milchejektionsreflex bedingte Prolaktinfreisetzung eingreift.

Trotz dieser verschiedenartigen Wirkungsweisen der beiden Bahnen vereinigen sie sich wieder, bevor Fasern mit dem NPV und NSO in Kontakt kommen.

Auf einen Reiz hin tritt nun die Freisetzung des Ocytocins aus der Hypophyse ein (s. 1.1.3). Über die Vena jugularis gelangt das Hormon in den Kreislauf zum Erfolgsorgan.

Die Beeinflussung dieser Freisetzung durch andere, über das Zentralnervensystem auf diesen Mechanismus einwirkende Einflüsse erscheint verständlich. So berichten Cleverly und Folley (1970) davon, daß der Mechanismus bei Kühen konditionierbar ist, also die Ocytocinfrei-

setzung auch ohne taktile Stimulierung möglich ist. Eine Verbindung mit dem limbischen System wird durch die von Peeters et al. (1973) gemachte Feststellung postuliert, daß Färsen, welchen das Kalb sofort nach der Geburt so genommen wurde, daß sie bestimmt keinerlei Kontakt mit ihm aufnehmen konnten, bei Anblick des Kalbes ohne physischen Kontakt einige Stunden später in 13 von 24 Fällen mit Milchejektion reagierten.

Ebenso ist dadurch der umgekehrte Effekt verständlich. Aulsebrook und Holland (1969b) beschreiben die zentrale Unterbindung einer Oxytocinfreisetzung; der Effekt wurde durch elektrische Reizung von Gehirnregionen beim Kaninchen verursacht.

Beim Menschen konnte durch Gaben von Äthanol die Oxytocinfreisetzung ebenso zentral gehemmt werden (Cobo 1973), wie dies zuvor schon bei Ratten (Fuchs 1969) erreicht wurde. An Ratten konnte auch der Einfluß von Geräuschen (Ogle und Locket 1966) auf die Oxytocinfreisetzung demonstriert werden. Auch die ursprünglichen Arbeiten von Ely und Peterson (1941) machten bereits deutlich, daß das "Aufziehen" der Milch bei Kühen nach Erschrecken als Verhinderung der Oxytocinfreisetzung aus dem HHL anzusehen ist.

1.2.4 Sonstige Wirkungen von Oxytocin

1.2.4.1 Wirkungen auf das Zyklusgeschehen

Armstrong und Hansel untersuchten 1959 den Einfluß wiederholter Oxytocininjektionen auf die Zykluslänge und stellten fest, daß sie, wenn sie unmittelbar im Anschluß an eine Brunst während der ersten Zykluswoche nicht laktierenden Kalbinnen täglich Oxytocin injizierten, den Zyklus von ursprünglich etwa 21 Tagen Länge auf 8 - 12 Tage verkürzen konnten.

1965 versuchten dann Donaldson et al. die Zusammenhänge weiter aufzuhellen. Ihre Versuche interpretieren sie dahingehend, daß Ocytocin die Plasma LH-Werte so niedrig halte, daß es nicht zu einer regelrechten Corpus Luteum-Bildung kommen könne.

1969 bestimmten Harms et al. mittels Radioimmunotest und Proteinbindungstest LH sowie Progesteron nach Ocytocin-gaben im gleichen Zeitraum. Sie konnten dabei keine Unterschiede des im Blut zirkulierenden LHS feststellen, allerdings registrierten auch sie eine Verkürzung der Zyklen. Eine geringere Progesteronkonzentration ab dem 5. Tag nach dem vorausgehenden Zyklus stellten sie fest.

Ähnliche Effekte konnte auch Fletcher (1973) an Schafen zeigen. Post partum kamen Tiere, die täglich mehrmals mit Ocytocin behandelt wurden, früher zu einer Brunst mit Ovulation, als Tiere, deren Lämmer saugen durften und die nicht behandelt wurden.

Bereits oben wurde die Arbeit von Flint und Mitarbeitern (1975) erwähnt, welche einen Zusammenhang zwischen Prostaglandinen und Ocytocin zum Zeitpunkt der Geburt nachweisen konnten. Möglicherweise ist die Beeinflussung des Zyklus auch nur über diesen Zusammenhang zu erklären, nachdem die luteolytische Wirkung von Prostaglandin bekannt geworden ist (McCracken 1971).

1.2.4.2 Wirkung auf den nicht tragenden Uterus

Schon bei dem Versuch, die biologischen Meßverfahren zu etablieren, stellten viele Autoren fest, daß der nicht tragende Uterus, abhängig vom Zyklus, auf Ocytocin durch Kontraktionen reagiert. Während der Brunst spricht der Uterus auf geringere Ocytocinkonzentrationen an als im Met- und Proöstrus.

Im Zusammenhang mit dem Fergusonreflex (s.S. 14) glaubte man, daß dies bei der Begattung den Spermientransport hin zum Eileiter fördere.

Ausführliche Untersuchungen an Färsen und Kühen, bei denen bei der künstlichen Besamung durch Ocytosingaben dieser Effekt imitiert werden sollte, erbrachten allerdings nicht das erwartete Ergebnis (Pohlmeyer 1972): es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren festgestellt werden. Master und Johnson (1970) zweifeln diese Funktion des Ocytocins zumindest beim Menschen an, da nach ihren Beobachtungen die Kontraktionen des Uterus nach dem Coitus entgegen der Spermienwanderungsrichtung verlaufen.

1.2.5 Ocytocin beim männlichen Geschlecht

Über die Rolle des Ocytocins beim männlichen Geschlecht ist nicht sehr viel bekannt.

1961 wiesen Debackere et al. durch raffinierte Kreislauf-Kreuzungsversuche Ocytocin beim Schafbock nach. Sie verbanden dazu den Kreislauf zweier Tiere derart, daß ein Ocytocinanstieg bei dem einen der beiden, Milchejektion beim anderen Tier hervorrief. 1972 berichteten Sharma et al. von einer durch den Coitus verursachten Freisetzung von Ocytocin beim Schafbock. Die Konzentrationen lagen im Maximum bei etwa 100 $\mu\text{U/ml}$. Einem dramatischen Anstieg unmittelbar nach dem Coitus folgte ein Abfall der Werte auf Null innerhalb von 5 Minuten.

Die Untersuchung von Bullen brachten ähnliche Ergebnisse (Sharma und Hays 1973), allerdings lagen die Werte zwischen 2 und 1000 $\mu\text{U/ml}$ 4 - 6 Minuten nach Kopulation, Ejakulation in eine künstliche Vagina oder nach einer manuellen Stimulation von Samenblase oder Samenleiterampulle. Durch die

exogene Zuführung von Ocytocin konnte Voglmayr (1975) die Zahl der ejakulierten Spermien erhöhen. Ågmo (1975) konnte diesen Effekt nur mit Vasopressin erreichen.

Sharma und Hays (1976) gaben Kaninchen Injektionen von Methallibure. Die dadurch verursachte Abnahme der Spermienzahl in den Ejakulaten konnten sie durch die gleichzeitige Gabe von 200 μ U Ocytocin/kg Körpergewicht verhindern. Sie vermuten, daß beim Kaninchen Ocytocin mit am Spermientransport in den Samenleitern beteiligt ist.

1.3 Meßverfahren für Ocytocin

1.3.1 Biologische Meßverfahren

Schon bald nach der Entdeckung der Hinterlappenhormone begann das Interesse der Kliniker, diese Substanzen therapeutisch anzuwenden (Bell 1909). Die sehr exakten Dosierungen, die für die Therapie notwendig sind, gleichzeitig die technisch ungleichmäßige Gewinnung der Hinterlappenextrakte, erforderten Meßmethoden, die zwar nicht sehr empfindlich sein mußten, jedoch gut reproduzierbar sein sollten.

1912 beschrieben Dale und Leidlaw ausführlich eine Methode der biologischen Prüfung von Hinterlappenextrakten durch Messen der Kontraktion der Muskulatur vom isolierten, jungfräulichen Meerschweinchenuterus, die gute Vergleichsmessungen zwischen Präparationen gestattete, Absolutwerte waren mangels entsprechender Standards nicht zu erlangen. Die Methode hatte jedoch den Nachteil, daß sie von anderen Labors nur sehr schwer nachgearbeitet werden konnte. Trotzdem wurde sie ziemlich lange angewandt. Zeitweilig war noch versucht worden, künstliche Standards chemisch definierter Substanzen zum Vergleich heranzuziehen, was sich aber als nicht brauchbar erwies (Roth 1914 a+b,

Späth 1918 a+b). Auf Betreiben Carl Voegtlin's wurde dann im Jahr 1925 ein internationaler Referenzstandard eingeführt, mit einer von Smith und McClosky (1924 a+b) entwickelten Extraktionsmethode war dann jedes Labor in der Lage, eigene Standards herzustellen und diese dann mit dem Internationalen Standard zu vergleichen (Burn und Dale 1922). Heute steht als Vergleichssubstanz der III. Internationale Standard zur Verfügung (Bangham, Musset 1958), abgesehen davon aber auch synthetisierte Präparate. Nachdem das Problem der Standardisierung gelöst war, bestand immer mehr Interesse daran, Messungen von Oxytocin zur Aufklärung der physiologischen Gegebenheiten vorzunehmen.

Die für die Standardisierung entwickelten Verfahren waren für diese Zwecke jedoch ungeeignet, da sie lediglich Reinsubstanz im Microgrammbereich erfassen, die Oxytocinkonzentrationen im Plasma liegen, wie oben beschrieben, jedoch im Nano- bzw. Picogrammbereich.

Von den zahlreichen Methoden und den Verbesserungen - die wichtigsten sind in Tabelle I zusammengefaßt - sind nachstehend nur die drei heute am häufigsten angewandten beschrieben.

1.3.1.1 Methode von Bisset et al. 1967

Eine laktierende Ratte, 250 - 350 g schwer, innerhalb von Tag 3 - 21 nach der Geburt, mit ca. 8 - 10 Jungen, wird mit Natrium-Pentobarbiturat (Nembutal z.B.) anästhesiert. Die Körpertemperatur wird bei 38 °C gehalten.

Um die Atemwege freizuhalten, wird die Trachea cannuliert, ebenso wird für i.v. Injektionen die Vena jugularis cannuliert. Ein weiterer Katheter wird in die Arteria femoralis eingeführt und möglichst nahe an die Mamma

Tabelle I Einige biologische Testmethoden für Oxytocin

Tierart/Organ	Empfindlichkeit	in vivo	in vitro	Besonderheiten	Autor	Jahr
<u>Meerschweinchen</u>						
a. Uterus	keine Angabe 200 µU		+	erster Test Verbesserung Meth.Dale	Dale, Laidlaw	1912
b. Milchdrüse	10 µU	+		Druckmess. in Mamma	Koll Kaller Tindal, Yokoyama	1952 1962
<u>Ratte</u>						
a. Uterus	keine Angabe		+	erstmalige Anwend.von Rattenuteri	Beauvillain	1943
	100 µU 200 µU		+	Uteri im Proöstrus 3malige Inj.von Stilb-	Holton	1948
			+	östrol je an einem Tag vor Test	Flatters	1954
				siehe Text Werte im Vergleich mit anderen Tests ca. 103-	Follet, Bentley	1964
b. Milchdrüse	2 µU 0,001 µU		+	fach zu hoch wie Tindal und Yokoyama	Rydén, Sjöholm van Dongen und Hays	1962 1966
	5 µU	+			Bisset et al.	1967
<u>Maus</u>						
a. Uterus				Trinkverhalten der Jungen	Vorherr et al.	1967
b. Milchdrüse	120 µU	+		dient als Parameter (auch bei Ratten)		
<u>Kaninchen</u>						
Milchdrüse	100 µU 100 µU		+	Vorbild f.Rydén,Sjöholm wie Mendez-Bauer et al.	Mendez-Bauer et al. Moore, Zarrow	1960 1965
<u>Schaf</u>						
Milchdrüse		+		Kreislaufkreuzung von 2 Tieren (laktiert)	Debackere et al.	1961
<u>Hahn</u>						
Kreislauf	20.000 µU	+		Standardisierungsmeth.	Coon	1939

versorgende Arterie herangebracht (Spitze möglichst zwischen Aa. epigastrica und poplitea). Von der am nächsten gelegenen Zitze wird der Druck mit einem Transducer, einem elektrischen Druckmeßgerät, über einen in die Milchdrüse eingeführten und mit Flüssigkeit gefüllten Katheter registriert. Der nach Injektionen von Ocytocin gemessene Druckanstieg wird als Maß für die verabfolgte Dosis gewertet und zwar im Vergleich mit Standardpräparationen. Dosierungen von weniger als 5 μ U sind meßbar. Die auftretenden Drucke sind maximal etwa 20 mm Hg. Der Test ist verhältnismäßig spezifisch für Ocytocin, da Histamin, Bradykinin und andere natürlich vorkommende Substanzen, die ebenfalls die Ejektion der Milch provozieren, nur in ziemlich hohen Dosen Wirkungen zeigen.

1.3.1.2 Test von Van Dongen und Hays (1966)

Der Test von Van Dongen und Hays ist ein *in vitro* Test und macht sich die Milchejektion als Meßgröße nutzbar. Ratten, mehr als 3 Tage nach der Geburt mit mehr als 3 Jungen, die wenigstens drei Stunden vor Testbeginn entfernt werden, werden mit Nembutal betäubt und ein Streifen der 4. Milchdrüse wird entfernt. Daraus werden Streifen von ca. 2 mm² geschnitten. Diese werden in ein Bad (Puffer) verbracht und dann wird unter einem Mikroskop beobachtet, wie viel Zeit nach der Zugabe von Ocytocin vergeht, bis die Milch aus den Alveolen gepreßt wird. Diese Zeit ist dosisabhängig, durch Vergleich von bekannten und unbekannten Dosierungen werden die unbekannten bestimmt. Die Empfindlichkeit ging bis zu 1 μ U im Testbad. Über Kreuzreaktionen mit anderen Substanzen wird nichts ausgesagt.

1.3.1.3 Test von Rydén und Sjöholm (1962)

Der Test von Rydén und Sjöholm ist ebenfalls ein *in vitro* Testsystem. Ratten, die zwischen 3 und 14 Tagen laktieren und mehr als 4 Junge haben, werden verwendet. Der ca. 2 x 4 x 30 mm große Streifen einer Milchdrüse der durch Nackenschlag getöteten Ratte wird entnommen und in einer Pufferlösung so aufgehängt, daß mittels eines Spannungsmessers die isometrischen Kontraktionen registriert werden können. Es werden auch in diesem Test unbekannte und bekannte Proben miteinander verglichen. Die Empfindlichkeit des Testes liegt bei 2 μ U. Die Spezifität für Ocytocin ist sehr gut.

Eine Beurteilung dieser eben beschriebenen Biotests wurde von Fabian et al. (1969) veröffentlicht. Ihrer Meinung nach kommen für die Testung von Ocytocin nur zwei Methoden in Frage: Der Test nach Rydén und Sjöholm und der von Bisset et al. entwickelte Test. Nach ihrem Urteil ist die Empfindlichkeit beider Tests gleich, die Genauigkeit ist ebenfalls gleichwertig. Wegen der geringeren Reaktion der *in vitro* - Präparation auf AVP halten sie diese Methode insgesamt für geeigneter und führen auch die Praktikabilität der Methode als Argument an. An anderer Stelle werden die Tests ebenfalls verglichen (McNeilly, Forsling, Chard 1971). Hierbei wurden mit der Van Dongen und Hays-Methode ca. 10-fach höhere Werte gefunden als mit den beiden anderen Tests; im übrigen erscheinen auch hier die Tests gleichwertig zu sein, dies trifft auch für den unten zu besprechenden Radioimmunotest zu.

1.3.2 Radioimmunologisches Meßverfahren

1.3.2.1 Radioimmunotest (RIT) allgemein

Seitdem Yalow und Berson 1960 für die Bestimmung von Insulin im Blut des Menschen eine radioimmunologische Bestimmungsmethode entwickelt hatten, ist dieses Meßverfahren

für die Bestimmung zahlreicher anderer Substanzen, die nur in geringen Konzentrationen im Blut zu finden sind, ausgenutzt worden. Das Prinzip beruht darauf, daß man an ein Protein markiertes und unmarkiertes Hormon (Standard oder unbekannte Proben) in vitro bis zu einem Gleichgewicht binden läßt. Da das markierte Hormon in konstanter Menge zugegeben wird, kann das nicht markierte es entsprechend seiner Konzentration aus dieser Verbindung drängen. Trennt man durch spezielle Verfahren gebundene und freie Phase, kann man anhand der gebundenen Radioaktivität auf einen größeren oder kleineren Anteil unmarkierten Hormons schließen.

Ein entscheidender Faktor - neben der Notwendigkeit, den zu untersuchenden Stoff in reiner Form für eine radioaktive Markierung und als Standard zur Verfügung zu haben - ist die Gewinnung eines spezifischen Antikörpers. Die Produktion solcher Antikörper erfolgt gewöhnlich in Kaninchen oder in Meerschweinchen.

1.3.2.2 Radioimmunotest Ocytocin

Je kleiner ein Molekül ist, desto geringer sind seine antigenen Eigenschaften. Da das Molekulargewicht von Ocytocin nur 1007 beträgt, besitzt das Hormon nur geringe Antigenität.

1965 erzeugten Gilliland und Prout Antikörper gegen Ocytocin (1965), indem sie es mit komplettem Freund'schen Adjuvans vermischten und subcutan, intradermal und in die Fußballen injizierten. Dies taten sie 3 x wöchentlich während zwei Wochen, dann in immer größeren Abständen. Auf diese Weise konnte ein Antikörper gewonnen werden, über dessen Spezifität, nicht jedoch über die Höhe des Titers etwas ausgesagt wird.

Gusdon (1967) beschreibt die Immunisierung von Kaninchen mit beigemengtem Carbodiimid, um eventuell dadurch das Ocytocin an körpereigene Proteine zu binden. Er vermengt das Immunisierungsgemisch ebenfalls mit Freund'schem Adjuvans und immunisiert nach einem ähnlichen Schema wie oben beschrieben. Mittels Fluoreszenzmethode kann er Antikörper nachweisen.

Bashore et al. (1970) konjugieren das Ocytocin vor der Applikation mittels Carbodiimid an Kaninchenserumalbumin. Die Immunisierung erfolgt wieder nach Vermengung mit komplettem Freund'schem Adjuvans in die Fußballen nach einem ähnlichen Schema. Das mit dieser Methode gewonnene Antiserum zeigte bei einer Komplementbindungsreaktion noch Wirkung bei einer Verdünnung von 1 : 3000.

Von den bisher erwähnten Autoren sind keine Arbeiten bekannt, wonach sie diese Antisera für den Radioimmunotest routinemäßig eingesetzt hätten. Eine Ausnahme bildet die Arbeitsgruppe von Chard, die nach einem ersten Bericht 1969 (Chard et al.) in den folgenden Jahren ausführlich über ihr Bemühen, einen Radioimmunotest zu entwickeln, berichtet (Chard et al. 1970 a; Chard et al. 1970 b; Chard et al. 1970 c sowie Boyd et al. 1972). Sie gewannen das Antiserum durch Injektion synthetischen Ocytocins, vermengt mit komplettem Adjuvans direkt in die Lymphknoten und die Milz. Für den RIT erfolgt die Markierung des Hormons mit Jod¹²⁵ und Jod¹³¹ nach der von Greenwood et al. (1963) beschriebenen Methode mit Chloramin T. Die Trennung von freier und gebundener Phase geschah mittels Ammoniumsulfat.

Die genannten Autoren konnten mit einem Antiserum Standardkurven aufstellen und nach Extraktion des Ocytocins aus biologischen Flüssigkeiten Konzentrationen bis ca. 1 µU/ml, manchmal sogar noch weniger, messen.

Zwei weitere Autoren konnten mittels Radioimmunotest physiologische Werte ermitteln: Seppälä (1972) berichtete über Ocytocinkonzentrationen in der Amnionflüssigkeit, dem fötalen Urin und im Mekonium beim Menschen, Kato und Torrigue berichten 1974 über die Messung von Ocytocin während der Geburt. Das von letzterer Gruppe verwendete Antiserum war in einer Verdünnung von 1 : 3000 verwendbar.

Da die Vorteile des Radioimmunotestes gegenüber dem biologischen Test in einer leichteren Handhabung und meist auch in einer größeren Effizienz (Probenkapazität) zu finden sind, war es Ziel dieser Arbeit, einen Test zu entwickeln, der die radioimmunologische Messung von Ocytocin im Plasma von Rindern ermöglicht.

2. Material und Methoden

2.1 Wichtigste Reagenzien und spezielles Labor- material

Das Ocytocin wurde uns dankenswerter Weise von der Fa. Sandoz zur Verfügung gestellt. Es lag wie folgt vor:

Synth. Ocytocin	200,0 I.U.
Chloreton	2,0 mg
Natriumacetat +3H ₂ O	2,0 mg
Eisessig	1,0 mg
Natriumchlorid	3,0 mg
Wasser ad 1 ml	

Das Ocytocin war in Ampullen zu 10 ml eingeschmolzen. Es wurden die Chargen Nr. 72014 und 74006 verwendet. Für einige wenige Untersuchungen stand noch Ocytocin mit 450 I.U./ml zur Verfügung. Für die Umrechnung von I.U. in g gilt:

450 I.U. $\hat{=}$ 1 mg, daher ist ca.: 1 μ U $\hat{=}$ 2 pg. Dieser Umrechnungsfaktor wurde bei allen Angaben verwendet.

Die Lösungsmittel wurden p.a. bezogen und vor Gebrauch destilliert, Äther wurde von der Fa. Hoechst bezogen, die Flaschen wurden nach dem Öffnen nur während eines Tages benutzt.

Spherosil XOA 400, 100 - 200 μ (JJ'Chromatography Ltd.) wurde vor dem ersten Gebrauch 2 Stunden bei 700 °C ge-
glüht und dann bei 100 °C aufbewahrt.

Die Proben wurden auf einem von der Hauswerkstatt der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt in Weihenstephan

hergestelltem Apparat über Kopf geschüttelt. Teströhrchen stammten von der Fa. Sarstedt (Best. Nr. 63/11).

An Puffern wurden verwendet:

TrisHCl-Puffer	ph 8,0	0,05 M	für Test
Phosphatpuffer	ph 7,5	0,05 M	Verdünnungen
Phosphatpuffer	ph 7,5	0,05 M	Test
	+ 500 mg H-Albumin/l		
Phosphatpuffer	ph 7,5	0,5 M	Markierung
Veronalpuffer	ph 8,6	0,1 M	Elektrophorese

Das verwendete Wasser stammte direkt aus der Entsalzungsanlage des Institutes.

Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Gammazähler der Fa. LKB-Wallac gezählt.

Bei dem in den folgenden Kapiteln als "Vortex" bezeichnetem Gerät handelt es sich um eine Gerät der Fa.

Scientific Industries Incorporation (USA), welches den Inhalt von Reagenzgläsern nach Aufdrücken auf eine ausgehöhlte Gummischeibe durch Rotieren dieser Scheibe bewegt und in der Regel gut durchmischt.

2.2 Immunisierung

Es wurden Kaninchen verschiedener Rassen, sowohl männliche als auch weibliche, aus der eigenen Zucht und auch zugekaufte Tiere mit einem Gewicht von ca. 2 kg für die Immunisierung verwendet. Das Antigen wurde gekoppelt und ungekoppelt appliziert.

- 2.2.1 Immunisierung mit nicht gekoppeltem Ocytocin
- 2.2.1.1 Injektion bei der ersten Applikation direkt in die Lymphknoten.

Für diese Untersuchungen standen 6 Kaninchen zur Verfügung. Das Ocytocin wurde aus den Ampullen entnommen und für jeweils 3 Kaninchen wurde folgende Mischung vorbereitet:

1 ml Ocytocinlösung (beim ersten Mal wurde die konzentriertere Lösung von 450 I.U. verwendet, dann immer die Lösung von 200 I.U.) wurde mit 2 ml komplettem Freund'schem Adjuvans so lange vorsichtig vermischt, bis eine schlagrahmartige Konsistenz der Mischung erkennbar war. Dies wurde dadurch bewerkstelligt, daß die Lösung in einer Glasspritze immer wieder mit nicht zu dünner Kanüle aufgezogen und anschließend wieder herausgepreßt wurde. Diese vorbereitete Mischung wurde dann bis zur eigentlichen Verwendung möglichst kühl gehalten.

Die Lymphknoten der Kaninchen wurden nach der von Forsling (persönliche Mitteilung) beschriebenen Weise operativ freigelegt und zwar der Knielymphknoten beiderseits, die beiderseitigen Inguinallymphknoten sowie bei den ersten drei Tieren auch die oberflächlichen Halslymphknoten beiderseits. Die Anästhesie erfolgte während der ersten Serie mit Nembutal intravenös, bei der zweiten Serie mittels Ketanest, da die intravenöse Applikation des Nembutal zu Nekrosen an den Ohrvenen führte und die Blutentnahme später Schwierigkeiten bereitete.

Die Operation wurde folgendermaßen durchgeführt:

Die mit Combelen (0,25 ml) vorbehandelten Hasen wurden in eine Box verbracht, so daß ihnen Nembutal (ca. 30 mg/kg intravenös) verabfolgt werden konnte. Das Nembutal wurde der leichteren Dosierung wegen vor der Applikation 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Mit einem Skalpell wurde nun in der Beuge ca. 1 Finger breit über dem Gelenk ein senkrechter Schnitt gesetzt. Die Haut wurde etwas abpräpariert und der oberflächliche Lymphknoten aufgesucht. Dies gelingt jedoch nur, wenn die Lymphknoten entsprechend gut entwickelt sind, in zwei Fällen konnte ich die Lymphknoten nicht einwandfrei identifizieren. In diesem Fall injizierte ich die Lösung in die oberflächliche Muskulatur dieses Bereiches. Nach Applikation von 1/6 ($\hat{=}$ ca. 0,2 ml) der Ausgangslösung wurde die Wunde mit Syntofil der Fa. Braun-Melsungen geschlossen. Die Fäden wurden auch in der Folgezeit nicht entfernt. Sie heilten problemlos ein.

Nachdem auch mit der zweiten Seite entsprechend verfahren worden war, wurden die Inguinallymphknoten freigelegt. Hierzu wurde im Schenkelspalt ein fast paramedianer Schnitt mit einer Schnittrichtung von craniolateral nach caudo-medial angelegt. Auch hier erwies sich das Aufsuchen der Lymphknoten manchmal als äußerst schwierig, da sie teilweise sehr klein sind, zum anderen auch leicht mit Fettgewebe verwechselt werden können. Es wurde in allen Fällen ebenfalls 1/6 der Lösung injiziert, allerdings war ich in zwei Fällen unsicher, ob es sich wirklich um die Lymphknoten gehandelt hat. Anschließend wurde die Wunde wie die ersten beiden verschlossen.

Die Freilegung der Halslymphknoten erfolgte nur bei 3 Tieren, da sie technisch schwierig ist und Probleme mit der Anästhesie über diesen langen Zeitraum auftraten. Hier wird paramedian zur Trachea eine Inzision gesetzt, die lang genug ist, um mit den Fingern die Haut im Nacken zu lösen und die mehr dorsal etwa in der Mitte des Halsbereiches liegenden Lymphknoten aufsuchen zu können. Die Suche nach den Lymphknoten gestaltet sich auch in diesem Bereich sehr schwierig, es konnten aber alle Lymphknoten aufgefunden werden. Die Wunde wurde hier ebenfalls mit Syntofil geschlossen, die Fäden nicht entfernt.

Eine besondere Infektionsprophylaxe wurde absichtlich unterlassen, um das Immunsystem der Tiere, insbesondere in den Bereichen, in denen die Injektionen erfolgten, nicht zu unterdrücken.

Bei der Injektion in die Lymphknoten wurden Kanülen Nr. 18 benützt; ich habe versucht den Lymphknoten nicht zu durchstechen.

Die Verlängerung der Narkose erfolgte ebenfalls durch Nembutal intravenös. Die Lösung wurde hierzu jedoch 1:3 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und nach Gabe von etwa 0,2 ml die Wirkung kontrolliert und erst dann, falls erforderlich, weiter injiziert. Zur Erleichterung dieser Maßnahme blieb eine Kanüle während der gesamten Operationszeit in der Ohrvene liegen.

Die Applikation des Ketanest in der zweiten Serie wurde entsprechend durchgeführt.

2.2.1.2 Injektion in ca. 50 Stellen im Nackenbereich

Die Kaninchen wurden im Nackenbereich geschoren und anschließend wurde mit einer Kanüle Nr. 18 an zahlreichen Stellen (ca. 50) subcutan die Injektionslösung gesetzt. Diese Methode wurde mit nicht konjugiertem Ocytocin einmal durchgeführt.

2.2.2 Konjugation von Ocytocin an Humanserumalbumin und an Thyreoglobulin vom Rind

Forsling (Manuskript, unveröffentlicht) beschreibt eine Methode zur Kopplung von Ocytocin an Humanserumalbumin (HSA), um mit diesem größeren Molekül eine bessere Antigenität des Komplexes zu erreichen. Auch andere Autoren

berichteten für Vasopressin von dieser Möglichkeit (u.a. Rosenbloom und Fischer 1974, Skowsky et al. 1974, Hayward et al. 1976); sie verwendeten das wesentlich größere Thyreoglobulin (TG) (MG ca. 600.000). In den eigenen Versuchen wurde das Ocytocin entweder an HSA oder an TG gekoppelt. Das Kopplungsschema wurde jeweils nach dem gleichen Prinzip durchgeführt (modifiziert nach Odell et al. 1972):

Es wurden zwei Lösungen hergestellt:

- I. 50 mg TG (bzw. HSA) in 2 ml Tris-HCl-Puffer
0,05 M ph 8,0
- II. 2,5 mg Carbodiimid in 0,5 ml Trispuffer (wie I) +
200 I.U. Ocytocin in 1 ml (Ocytocin Sandoz) +
0,1 ml markiertes Ocytocin als Kontrolle der Kopplung.

Unter Rühren mittels eines Magnetrührers wurde Lösung II in Lösung I tropfenweise eingerührt.

Anschließend wurden 0,05 ml der Lösung zur Messung der Radioaktivität entnommen.

Die beiden Lösungen wurden nun bei Zimmertemperatur 20 Stunden gemischt.

Nun wurden die Lösungen in einen Dialysierschlauch überführt und in der Folgezeit über 24 Stunden gegen 0,01 M Trispuffer ph 8,0 dialysiert. Dies wurde ebenfalls bei Zimmertemperatur durchgeführt. Nun wurden wieder 0,05 ml zur Kontrolle der gebundenen Aktivität entnommen. Zur Einengung des Volumens und zur leichteren Aufbewahrung wurde die Lösung anschließend gefriergetrocknet.

In einem späteren Arbeitsgang wurde nach dem gleichen Schema vorgegangen, jedoch wurde von allen Reagenzien die 3-fache Menge verwendet. Das gefriergetrocknete Produkt wurde dann für die folgenden Boosterungen verwendet.

Die Erstimmunisierung der Kaninchen mit dem gekoppelten Ocytocin erfolgte nach dem unter 2.2.1 geschilderten Verfahren. Drei Kaninchen standen für die Untersuchungen mit dem an HSA gekoppelten Material und ebenfalls drei Kaninchen für die Untersuchungen mit dem an TG gebundenen Ocytocin zur Verfügung.

2.2.3 Schema der Immunisierung

Unabhängig vom Modus der Erstimmunisierung wurden die folgenden Boosterungen immer nach dem gleichen Muster durchgeführt. 6 Wochen nach der Erstimmunisierung wurden die Kaninchen mit einer etwas geringeren Dosierung (ca. 50 %) an mehreren Stellen subkutan im Nackenbereich injiziert. Zusätzlich wurde das Antigen, das wie bei der Erstimmunisierung mit komplettem Freund'schem Adjuvans vermischt war, noch intramuskulär und intraperitoneal verabfolgt.

Zwei Wochen darauf erfolgte die nächste Boosterung mit der ersten Blutentnahme. Dann wurde noch zweimal in 14-tägigem Abstand Blut entnommen und geboostert. In der Folgezeit wurden die Abstände wieder vergrößert und in ca. 6-wöchigem Rhythmus Blut entnommen. Konnte nach der zweiten Blutentnahme überhaupt kein Titer festgestellt werden, so wurde die Immunisierung abgebrochen und das Tier getötet.

2.3 Markierung

Die Markierung des Ocytocins wurde mit ¹²⁵Jod durchgeführt. Das Prinzip der Markierung besteht darin, daß das als Natriumjodid vorliegende Jod aus seiner Ionenform mittels

eines Oxydationsmittels in die naszierende, sehr reaktive Form verbracht wird und damit am Tyrosinring ein H-Atom durch ein Jod verdrängt wird. Die zur Umwandlung des Jods erforderlichen Reagenzien sollen die Eiweißstruktur des Moleküls möglichst nicht beeinflussen bzw. das markierte Hormon soll die Eigenschaften des natürlichen "kalten Hormons" nicht verlieren.

Drei Methoden wurden zur Markierung angewendet:

Die von Greenwood et al. (1963) beschriebene Methode mit Chloramin T, die mit Laktoperoxydase und H_2O_2 von Frantz und Turkington (1972) beschriebene Methode und als dritte die von Rosa et al. (1964) beschriebene elektrische Methode der Jodierung.

2.3.1 Chloramin T-Methode

Die von Greenwood et al. (1963) entwickelte Methode wurde von Chard et al. (1970) etwas modifiziert und ich habe diese Methode ebenfalls leicht verändert angewandt.

Die Reagenzien waren:

0,005 ml Ocytocin (Sandoz, 200 I.U./ml)

0,010 ml Chloramin T-Lösung (5 mg/10 ml in Tris-HCl-Puffer)

0,050 ml Na ^{125}J -Lösung (0,5 M PO_4 -Puffer)

2,0 g Dowex 2 x 8

25 ml Tris-HCl-Puffer + 12,5 g $Na_2S_2O_5$ (Natriummetabisulfit)

Das Na-Jodid befindet sich in einer silikonisierten Ampulle. Mittels einer Konstriktionspipette werden an die Glaswand je ein Tropfen mit den 0,005 ml Ocytocinlösung und 0,01 ml der direkt frisch zubereiteten Chloramin-T-Lösung gesetzt. Dann wird das Gläschen 5 sec auf einem "Vortex" geschüttelt und anschließend in 25 ml Puffer geworfen, die zum Abstoppen der Reaktion Natriummetabisulfit enthalten.

Es wird nun mit einer Eppendorfpipette ein Aliquot von 0,1 ml entnommen und an einem Gammameßplatz die Aktivität bestimmt.

Um das ungebundene Jod zu entfernen, wird anschließend Dowex 2 x 8, ein Ionenaustauscher, zugegeben. Der Ionenaustauscher wird gut mit der Lösung geschüttelt und kann sich dann absetzen. 0,1 ml werden jetzt zur Kontrolle entnommen und gezählt.

Nach guter Markierung wurde das radioaktive Hormon in Lösung tiefgefroren und ca. 6 Wochen für die Untersuchungen verwandt.

2.3.2 Enzymatische Markierung

Die oben erwähnten Autoren beschrieben diese Markierung 1972 im Rahmen eines Rezeptorassays für Prolaktin. Da insbesondere die schonende Markierung die biologischen und damit natürlich auch die immunologischen Eigenschaften erhält, wurde auch diese Methode versucht.

Sie wurde entsprechend der von Schams und Schallenberg (1976) für FSH beschriebenen Vorschrift durchgeführt:

Reagenzien:

0,005 ml Ocytocin (Sandoz, 200 I.U./ml)

0,050 ml Na ¹²⁵J (ca. 1mCi)

0,025 ml Laktoperoxydase (Boehringer) (≅ 6150 ng)

0,010 ml H₂O₂ (≅ 0,86 mM ≅ 1500 ng)

Die Reagenzien werden in dem Glasgefäß, in dem sich das Jod befindet, zusammengebracht und dann innerhalb von 15 Minuten auf dem "Vortex" mehrmals geschüttelt. Dann wird das Reaktionsgemisch über eine Sephadex G 50 Säule vorge-reinigt. Die Abtrennung des freien Jod erfolgt mit Dowex.

Die Aufbewahrung des radioaktiven Materials erfolgte auch hier im Gefrierschrank bei ca. -20 °C.

2.3.3 Elektrische Markierung

Die bisher beschriebenen Methoden haben den Nachteil, daß mit dem zu markierenden Hormon eine andere chemische Substanz zusätzlich zu dem radioaktiven Jod in Kontakt tritt. Um dies zu vermeiden, beschritten Rosa et al. (1964) einen anderen Weg. Sie setzten in einem Platintiegel, der als Anode dient, das zu markierende Hormon sowie die Jod-Salzlösung an. Als Kathode dient ein Platindraht in einem Glasrohr, welches zum Anodenraum hin durch eine halbdurchlässige selbst hergestellte Kollodiummembran getrennt ist und mit einer Salzlösung gefüllt ist. Durch Eintauchen dieses Glasrohres in den anodischen Platinbecher wird die elektrische Verbindung hergestellt.

Die Methode ist von Hladik (1966) mit Erfolg zur Markierung von Humanserumalbumin und von Kluge et al. (1969) zur Markierung von Insulin benutzt worden. 1971 nutzten Kurkbart et al. diese Methode zur Angiotensin II-Markierung.

Nachdem ich mit Hilfe von Herrn Dr. Stanzl vom Institut für Landtechnik* ein Gerät bauen konnte, welches die Anforderungen, die die elektrische Markierung stellt, erfüllt (Regelung der Spannung von 0 - 750 mV bei sehr kleinen Strömen, während der Markierung treten Ströme von maximal 60 µA auf), setzte ich in einem ausgeglühten Platintiegel, der als Anode diente, an:

0,050 ml Na ^{125}J ($\hat{=}$ ca. 0,5 mCi)
0,01 ml Ocytocin (Sandoz 200 I.U./ml)
1,0 ml Kaliumjodid 10^{-4} M
0,2 ml NaCl

* Fachbereich Landwirtschaft und Gartenbau der TU München in Weißenstephan

Den Kathodenraum füllte ich mit 2,0 ml NaCl.

Bei Beginn der Markierung entnahm ich 0,02 ml, um die Radioaktivität zu messen. Die Markierung dauerte 90 Minuten. Die angelegte Spannung variierte zwischen 400 mV und 750 mV; die dabei maximal auftretende Stromstärke lag bei ca. 60 μ A.

Zu Vergleichszwecken markierte ich auch Prolaktin mit der elektrochemischen Methode. Der Ansatz entsprach dem für Ocytocin beschriebenen.

Der Erfolg aller Markierungsmethoden wurde durch Elektrophorese überprüft. Ein Tropfen der Lösung mit dem markierten Ocytocin wurde mit 0,3 ml Pferdeserum 1:4 und 0,2 ml Phosphatpuffer (0,05 M) kräftig vermischt. Auf ein in einer mit Veronalpuffer gefüllten Kammer liegendes Whatmannpapier wurde 1 Tropfen dieser Lösung gegeben und bei 360 V 90 Minuten lang die Elektrophorese durchgeführt.

Die Streifen wurden dann getrocknet und in zentimeterbreite Streifen geschnitten.

2.4 Inkubation: Volumen, Dauer, Temperatur

2.4.1 Volumen

Die Frage des Volumenansatzes mußte unter dem Gesichtspunkt der zur Verfügung stehenden Antisera gelöst werden. Es ergab sich daraus die zwingende Forderung, möglichst mit einem geringen Volumen zu arbeiten, um Antiserum zu sparen. Der Testansatz war in der Regel wie folgt:

0,1 ml Standard bzw. Testlösung
0,01 ml Antiserum
0,01 ml markiertes Hormon (ca. 6000 - 10 000 CPM)

Bei Testung der Antisera auf ihre Bindungsfähigkeit wurde
0,1 ml Antiserumverdünnung und
0,01 ml markiertes Hormon angesetzt.

2.4.2 Inkubationsdauer und Temperatur

Bei Austestung der Antisera wurde der Ansatz über Nacht bei Zimmertemperatur belassen und dann am nächsten Morgen ausgewertet. Alle übrigen Tests wurden zuerst mit dem "kalten" Hormon im Kühlschrank 5 Tage vorinkubiert, dann wurde das markierte Hormon zugegeben, 24 Stunden später erfolgte dann die Zugabe von 2. Antikörper und Ammoniumsulfat (0,1 + 0,05 ml). Es wurde immer im Kühlschrank (4 °C - 8 °C) inkubiert.

2.5 Trennverfahren

Nach der Inkubation des Ansatzes wurden zwei Methoden für die Trennung der gebundenen von der freien Phase angewendet. Einmal die von Chard et al. (1970a) beschriebene Methode der Ausfällung mit Ammoniumsulfat und zum anderen eine etwas modifizierte Doppelantikörpermethode, wie sie am Institut für die Auswertung von Proteohormonen angewendet wird (u.a. Schams, Schallenberger 1976).

2.5.1 Ammoniumsulfatmethode

Ammoniumsulfat reinst der Fa. Merck wird mit Aqua dest. in eine gesättigte Lösung unter Rühren auf dem Magnetrührer gebracht. In jedes Teströhrchen werden 0,1 ml einpipetiert ($\hat{=}$ Inkubationsvolumen). Die Röhrchen werden

dann auf dem "Vortex" geschüttelt und anschließend werden die Teströhrchen in einer Kühlzentrifuge bei ca. 2000 g nicht unter 35 Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wird dann aus dem Röhrchen mittels einer Pasteurpipette und einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt (wegen des radioaktiven Materials muß eine Auffangflasche dazwischen geschaltet werden). Danach werden die Röhrchen im Gammazähler gezählt, im allgemeinen 1 Minute. Bei sehr schlechter Bindung wurden die Röhrchen wegen der Genauigkeit so lange gezählt, daß nach Möglichkeit 10 000 Imp. gezählt wurden, jedoch nicht unter 5.000 Imp.

Die Auswertung der Zählraten wird im Punkt 2.7. beschrieben.

2.5.2 Doppelantikörpermethode

Die Präzipitation des Antikörper-Hormon-Komplexes kann auch durch die Zugabe eines weiteren gegen den ersten Antikörper gerichteten Antikörpers erfolgen.

Am Institut stand ein Antikörper gegen Kaninchengammaglobulin zur Verfügung. Er stammt vom Schaf und wurde von uns durch Immunisierung eines Schafbockes gewonnen.

Der Komplex des Ocytocins mit seinem Antikörper präzipitiert nicht oder nur teilweise, wenn der zweite Antikörper allein zugegeben wird. Erst durch das Hinzufügen von 0,05 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung kann der gesamte Komplex zur Ausfällung gebracht werden.

24 Stunden nach Zugabe des markierten Hormons werden dem Teströhrchen 0,05 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung und im Anschluß daran 0,1 ml Antigammaglobulin vom Schaf, hier

in einer Verdünnung von 1:14 (Arbeitsverdünnung) einpipetiert. Nach 36 Stunden werden in jedes Teströhrchen 2 ml einer 1:4 verdünnten gesättigten Ammoniumsulfatlösung verbracht. Die Erhöhung des Reaktionsvolumens zu diesem Zeitpunkt hat den Zweck, eventuell im Glas verbleibende Resttropfen mit möglichst geringer Aktivität zu erhalten. Die Proben werden nun 45 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, dies geschah meist in einer MSE 6L Kühlzentrifuge, die bei einer Umdrehungszahl von 3000 UpM ca. 2000 g erreicht. Anschließend wurden die Proben abgekippt. Eventuelle Resttropfen wurden, nachdem die Proben für kurze Zeit kopfüber gestanden hatten, mit einer zellstoffumwickelten Pinzette entfernt. Die im Röhrchen verbliebene Aktivität wurde in einem Gammazähler der Firma Wallac normalerweise 1 Minute lang gezählt. War die Bindung schlecht bzw. aus anderen Gründen nur sehr wenig Radioaktivität in den Teströhrchen, so wurde so lange gezählt, daß die wichtigsten Proben zumindest 5000 Imp.erreichten.

2.6 Extraktionsverfahren

Wie im Literaturteil erwähnt, ist Ocytocin im Plasma nur unter ganz bestimmten physiologischen Bedingungen in höheren Konzentrationen zu finden. Die Basiswerte dieses Hormones liegen nach den bisherigen Erfahrungen unter 1 $\mu\text{U/ml}$ Plasma. Es ist daher notwendig, wenn nicht ein außergewöhnlich empfindlicher Test zur Verfügung steht, das Hormon aus einem größeren Volumen zu extrahieren, um dann diesen Extrakt in einem kleinen Volumen aufzunehmen und zu messen. Die Extraktion ist auch dann von Vorteil, wenn befürchtet werden muß, daß andere Substanzen in den biologischen Flüssigkeiten, in denen man messen will, diese Messung stören.

2.6.1 Spherosil

Zur Extraktion des Ocytocins wurde in erster Linie die von Boyd et al. (1972) empfohlene Spherosilextraktion modifiziert versucht. 100 mg Spherosil XOA 400 100 - 200 μ werden zu 5 ml Plasma, die bereits mit 1 ml HCl vermischt wurden, gegeben.

Das Plasma befindet sich in einem Plastikröhrchen, welches unten konisch zuläuft und ein Volumen von 12 ml hat. Nach Zugabe des Spherosils wird das Röhrchen mit einem Plastikstopfen verschlossen und bei etwa 20 - 30 Umdrehungen/min kopfüber für 10 Minuten geschüttelt. Nun wird das Röhrchen kurz bei etwa 2000 g zentrifugiert, der Überstand wird abgesaugt und verworfen.

Als nächstes wird 1 ml Salzsäure 1 N zupipettiert, das Röhrchen wird auf dem "Vortex" gut durchgeschüttelt und dann erneut bei 2000 g kurz zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt; nun wird der eben beschriebene Vorgang mit Aqua dest. 2 x wiederholt.

Im folgenden werden nun 2 ml Aceton 80 % zugegeben und die Probe erneut auf dem "Vortex" gemischt. Dies soll 30 sec für jede Probe erfolgen.

Nun wird erneut zentrifugiert und danach wird der Überstand mit einer Pasteurpipette sehr vorsichtig in ein silikonisiertes 10 ml Glas überführt, auf keinen Fall dürfen Spherosilteilchen bei diesem Vorgang mit in das Glas überführt werden.

Zur Reinigung wird nun ein gleiches Volumen Äther zugegeben und nach kurzem Schütteln wird die obere organische Phase mit einer Pasteurpipette entfernt und verworfen.

Der im Glas befindliche Rest wird nun unter einem Luftstrom oder unter Stickstoff bei einer Temperatur von 40 °C niedergetrocknet. Die Extraktion mit anderen Mitteln wurde entsprechend durchgeführt; wo Besonderheiten waren, wird im Ergebnisteil speziell darauf hingewiesen.

(Der Extrakt ist auch für einen biologischen Test verwendbar.)

2.6.2 Lösungsmittel

Die Extraktion mit Lösungsmitteln geschah derart, daß zu einem bestimmten Plasmavolumen das Lösungsmittel pipetiert wurde. Nun wurde das Präzipitat abzentrifugiert und das Lösungsmittel in ein entsprechendes silikonisiertes Glas verbracht. Ein Reinigungsschritt wurde nach dem oben geschilderten Verfahren angeschlossen. Auf die Besonderheiten bei einzelnen Versuchen wird im Ergebnisteil hingewiesen.

2.7 Auswertung der Zählraten

Die Bestimmung der unbekannten Proben in einem Radioimmuno-test wird durch einen in jedem Test mitlaufenden neuen Standard ermöglicht. Die übliche Methode ist es, dazu die Standardwerte auf Millimeterpapier aufzuzeichnen und die Unbekannten aus dieser Standardkurve zu bestimmen.

Der Arbeitsgang ist dabei folgender:

6 bis 8 Standardwerte werden in ein Koordinatensystem eingetragen. Die X-Achse steht für die Menge des zugegebenen kalten Hormons, die Y-Achse für die entsprechenden CPM. Statt der CPM kann auch die absolute Bindung, ausgedrückt in Prozent, oder die relative Bindung, ebenfalls in Prozent, bezogen auf den Wert der maximalen Bindung (= Antikörper nur mit markiertem Hormon) eingetragen werden. Der nächste Schritt ist nun, die einzelnen Punkte mit Hilfe eines

Kurvenlineals möglichst so zu verbinden, daß die Kurve ein gleichmäßiges Bild zeigt. Die unbekannten Proben werden dann dergestalt bestimmt, daß auf der Y-Achse der entsprechende CPM-Wert bzw. Prozentwert aufgesucht und waagrecht der Schnittpunkt mit der Kurve bestimmt wird. Senkrecht unter dem Schnittpunkt mit der Kurve wird der dazugehörige Wert an kaltem Hormon abgelesen.

Der Nachteil dieser Methode ist, daß sie bei großen Testserien (ca. 1000 Posten) sehr viel Zeit erfordert und nach mehreren Stunden sehr leicht Ablesefehler auftreten können. Es sollte nun mit Hilfe eines WANG-Kleincomputers 700 C versucht werden, ein Programm zu entwickeln, welches die oben geschilderten Aufgaben übernehmen sollte.

Als Peripheriegeräte standen ein Plotter (aut. Zeichengerät) sowie ein Lochstreifenleser zur Verfügung. Aus den von der Fa. WANG angebotenen Programmen wurde das Programm "polynome Regression" für vorliegende Zwecke ausgewählt. Durch Probieren stellte ich fest, welches Regressionspolynom unsere Standardkurven ausreichend genau beschreibt; die Kontrolle war durch das Zeichnen der Kurven leicht möglich.

Es zeigte sich, daß mit einer Gleichung 5. Grades die mathematische Beschreibung unserer Standardkurven unter Normalbedingungen ausgezeichnet möglich war.

Im folgenden war aber nun die Schwierigkeit, daß Gleichungen 5. Grades, von Ausnahmen abgesehen, nicht lösbar sind. Um dieses Problem zu umgehen, habe ich bei der Berechnung der Standardkurven die X-Achse mit der Y-Achse vertauscht, das heißt auf den Radioimmunotest bezogen, daß die X-Werte für Prozent-Bindung stehen und die Y-Werte für die Menge des gesuchten kalten Hormons (Abb. 3 und Abb. 4).

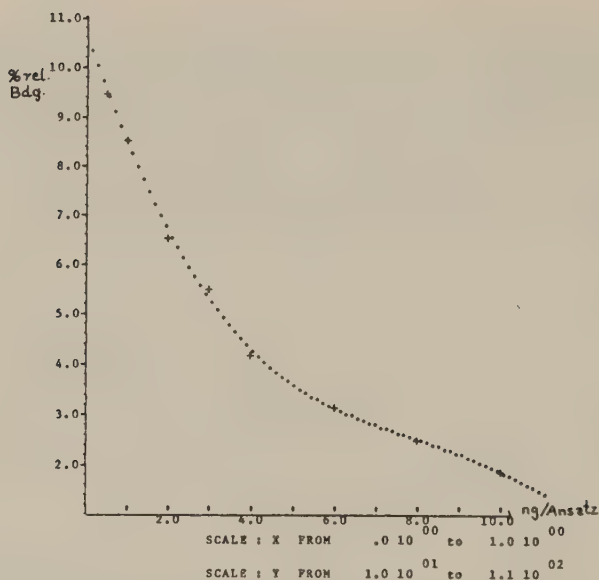


Abb. 3: Die vom Rechner als Gleichung 5. Grades berechnete und gezeichnete Standardkurve bei üblicher Verwendung von X-Achse und Y-Achse.

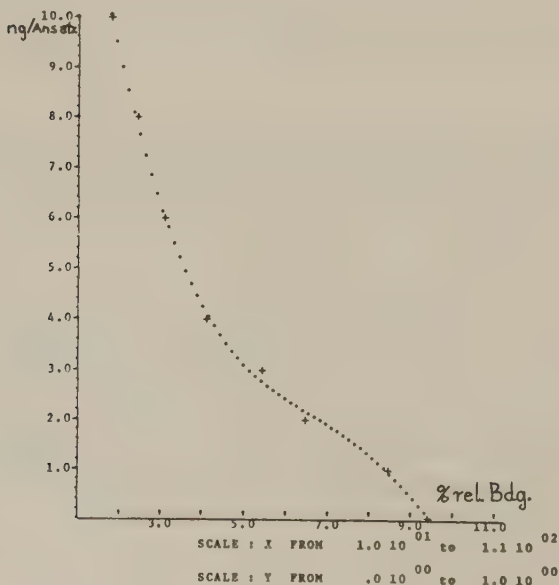


Abb. 4: Die gleiche Standardkurve wie in Abb. 3: Es wurden nur X- und Y-Achse vertauscht.

Die Auswertung der Tests verläuft nun nach folgendem Schema: Alle Werte der im Probenwechsler gezählten Proben werden über eine Teletype ausgedruckt und gleichzeitig über Lochstreifen ausgestanzt. Die zusammengehörenden Proben werden hintereinander gezählt. Als erstes wird die Gesamtaktivität einiger Proben bestimmt. Über den Lochstreifen wird als erstes diese Gesamtaktivität in den Rechner eingelesen (siehe Tabelle 2).

Manuell werden nun die Werte für die maximale Bindung eingetippt und die Prozente absoluter Bindung berechnet. Die nun eingegebenen Standardwerte werden zuerst mit der ihnen zugehörigen CPM-Zahl und anschließend nach 2 bzw. 3 Werten mit der dazugehörigen Menge des Hormons eingetippt. Der Rechner berechnet die relative Bindung jedes Wertes und druckt anschließend den Durchschnitt der Doppel- bzw. Dreifachbestimmung aus. Diese Durchschnittswerte speichert er ab.

Sind alle Werte eingegeben, wird mittels der polynomen Regression die Standardkurve berechnet und gezeichnet.

Nach Ausdruck der für die Kurve ursprünglich eingegebenen Werte und den Werten, die aufgrund der Berechnung nun zugrundegelegt werden, können über den Lochstreifenleser beliebig viele Testproben berechnet werden. Ich habe das Programm so gestaltet, daß jeweils zwei Proben als Einheit angesehen werden; es wird der Gehalt pro Milliliter berechnet, wobei ich Verdünnungen nicht berücksichtigen konnte; von diesen zwei Proben wird der Mittelwert bestimmt. Liegen die beiden Proben mehr als 12 % auseinander, druckt der Rechner keinen Mittelwert aus.

Als weitere Kontrolle kann der Bediener des Rechners den Teil der Standardkurve festlegen, in welchem Proben berechnet werden sollen. Liegen die Proben außerhalb dieses

Tabelle II

Arbeitsanweisung zur Testauswertung mit Wang-Computer

1. Alle Geräte einschalten, Lochstreifen einlegen
Plotter: linker Rand bei "5", rechter Rand bei "130"
automatic
2. Band einlegen, REWIND-TAPE READY-PRIME-LOAD PROGRAM-GO
3. 1. Datum eintippen GO
2. Datum eintippen GO
4. Für Prolaktin SEARCH 2
LH SEARCH 3
FSH SEARCH 4
andere Schreibmaschine auf manual
mit der Hand schreiben, wieder
auf automatic SEARCH 9
5. Eintippen 1. Probennummer Gesamtaktivität GO
eintippen letzte Probennummer plus 1 Gesamtaktivität GO
6. eintippen Imp. max. Bindung
x₁ GO
x₂ GO
nach letztem Wert SEARCH 6
7. eintippen Impulse Standardwerte wie 6
nach jeweils letztem Wert SEARCH 7, eintippen
zugehöriger ng-Wert GO
8. sind alle Standardwerte eingegeben SEARCH 8
9. eintippen Durchschnitt Imp. max. Bdg. GO
10. eintippen höchster %-Wert GO,
eintippen geringster %-Wert GO bis zu welchen ausgewertet
werden soll
eintippen Korrekturimpulswert GO,
eintippen Multiplikationsfaktor GO
11. Eingabe 1. Probennummer GO
Soll bei 5. neu begonnen werden SEARCH 9
Soll bei 10. neu begonnen werden SEARCH 2
Soll bei 11. neu begonnen werden SEARCH 3

Bereiches, werden sie zur Kontrolle zwar berechnet, jedoch wird kein Mittelwert ausgedruckt und der Vermerk gemacht, daß die Proben nicht zu verwenden seien. Dies geschieht auch, wenn nur eine der Doppelproben nicht im Meßbereich liegt.

Das Programm ermöglicht es zudem, bestimmte Auswertungsgruppen zusammenzufassen, nach deren Ende das Programm dann stoppt, so daß der Übersicht wegen Überschriften oder Kennzeichnungen des Ausdruckes möglich sind.

Die Rechengeschwindigkeit des Rechners liegt mit Ausdruck bei etwa 4 Doppelproben pro Minute.

Die Ausdrucke dienen dann zum Eintrag der bestimmten Werte in die Versuchsprotokolle; wie oben erwähnt, müssen die Verdünnungen, falls welche angesetzt werden, separat berechnet werden.

2.8 Vorgehen bei Tastversuchen

Im Rahmen eines Gemeinschaftsversuches des Sonderforschungsbereiches 141 der DFG an der TU-München wollten wir die Ocytocinkonzentration im Plasma von Kühen während des Melkens unter verschiedenen Bedingungen messen. In einer ersten Versuchsserie galt es, den Einfluß des Vakuums zu überprüfen.

Die Untersuchungen wurden auf der Versuchsstation Veitshof der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt Weißenstephan durchgeführt. Die Tiere werden in einem Offenstall gehalten und kommen, nachdem sie vor der Melkzeit in einen Warteraum getrieben wurden, unbeeinflusst in einen Melkstand, der 4 Tieren Platz bietet. Die Blutentnahme konnte aus technischen Gründen jedoch nicht gleichzeitig an zwei

oder mehr Tieren, sondern nur an einem Tier durchgeführt werden; es war gleichgültig, an welchem der 4 Stände es gemolken wurde. So erfolgte die Auswahl der Versuchstiere nach der "Melkrangordnung", das heißt, daß nach Beratung durch den Melker je ein Tier, welches in der Regel zu Beginn des Melkens kam, eines, welches normalerweise in der Mitte und eines, welches generell zu Ende der Melkzeit in den Melkstand kam, für die Untersuchungen bestimmt wurde.

Die Versuchsserie lief über 10 Wochen nach folgendem Schema:

1. Woche	Eingewöhnung der Tiere bei 0,5 bar	
2. Woche	Messung	" 0,5 "
3. Woche	Eingewöhnung	" 0,4 "
4. Woche	Messung	" 0,4 "
5. Woche	Eingewöhnung	" 0,5 "
6. Woche	Messung	" 0,5 "
7. Woche	Eingewöhnung	" 0,6 "
8. Woche	Messung	" 0,6 "
9. Woche	Eingewöhnung	" 0,5 "
10. Woche	Messung	" 0,5 "

Während der mit "Messung" bezeichneten Wochen wurden vom Institut für Landtechnik* Milchflußkurven aller Tiere aufgezeichnet und von den ausgewählten Versuchstieren wurden über einen Dauerkatheter mittels einer Peristaltikpumpe Blutproben genommen. Diese kontinuierliche Blutentnahme erlaubte es, pro 30 sec. ca. 20 - 30 ml Blut zu entnehmen. Das Blut wurde in mit Natriumheparinat präparierte Zentrifugenröhren der Fa. Sarstedt aufgefangen, welche in

* Fachbereich Landwirtschaft und Gartenbau der TU München
in Weihenstephan

einem Eisbad standen. Die Kontrollproben wurden mit 20 ml Plastikspritzen gewonnen. Nach Versuchsende wurden die Proben im Labor bei 4 °C zentrifugiert, das Plasma wurde in Plastikröhrchen übergeführt und dann in einem Gefrierschrank bei etwa -20 °C bis zur Austestung aufbewahrt. Von den Proben wurde im Rahmen einer anderen Arbeit auch Prolaktin bestimmt.

Die Plasmaproben wurden zum Test aufgetaut und nach dem unter 2.6.1 geschilderten Verfahren extrahiert, die Extraktion wurde durch Zugabe von markiertem Ocytocin überprüft.

Während der Versuche wurde eine strenge Melkroutine eingehalten: nach Eintreten in den Stand wurde von einer über dem Melkstand angebrachten Brücke der Katheter des Tieres an die Peristaltikpumpe angeschlossen und der Beginn der Blutentnahme auf dem für die Aufzeichnung der Milchflußkurven mitlaufendem Schreiber markiert. Gleiches geschah für die übrigen Tätigkeiten während des Melkens. Die Tiere gewöhnten sich sehr rasch an die nur zu Beginn und am Ende des Versuchs eingreifende Person. Während des Melkvorganges wurde das Tier - bedingt durch die Entnahme mittels Pumpe - in keiner Weise beeinflusst. Die Tiere erhielten während des Melkens ihre gewohnte Kraftfütteration.

3. E r g e b n i s s e

3.1 Antisera

3.1.1 Kopplung von Ocytocin an Humanserumalbumin (HSA) und Thyreoglobulin (TG)

Die Kopplung von Ocytocin an HSA und TG wurde durch radioaktiv markiertes Hormon überprüft. Das Ergebnis ist in Tabelle III zusammengefaßt.

Versuch Nr.	Bindung an HSA	Bindung an TG
1	13,8 %	18,11 %
2	19,7 %	41,8 %
3	-	6,8 %

Tabelle III: Prozentuale Bindung von markiertem Ocytocin an HSA / TG bei Kopplungsversuchen.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß in allen Fällen eine Bindung des markierten Ocytocins stattgefunden hat. Die Werte des an TG gebundenen Hormons schwanken sehr.

3.1.2 Immunisierung

Von den insgesamt 13 von mir immunisierten Kaninchen zeigten zwei der Tiere eine befriedigende Antikörper-

bildung gegen Ocytocin. Es handelt sich dabei jeweils um ein Tier der Serien, in welchen die Erstimmunisierung in die Lymphknoten erfolgte, und zwar um die Tiere Ocy 1 und Olaf 3. In beiden Serien entwickelte ein weiteres Tier einen schwachen Titer, das beste Antiserum dieser beiden Tiere band bei einer Endverdünnung von 1 : 100 50 % des zugegebenen markierten Hormons. Die Immunisierung mit dem gekoppelten Ocytocin war immer erfolglos, die Immunisierung erfolgte hier nicht direkt in die Lymphknoten, sondern subkutan an zahlreichen Stellen im Nackenbereich.

Die Entwicklung der Antikörper ist am Kaninchen Ocy 1 sehr gut zu verfolgen. In Abbildung 5 habe ich den Anstieg über 9 Monate hin aufgezeichnet. Die Werte für das Kaninchen Olaf 3 sind ebenfalls mit eingezeichnet.

Die zum Teil etwas größeren Punktabstände von einer Titerfeststellung zur nächsten sind darauf zurückzuführen, daß es mir nicht immer gelang, hämolysefreies Serum zu gewinnen. Diese Sera wurden nicht in die Untersuchung einbezogen, da dadurch ocytocinabbauende Fermente im Testsystem vorhanden sein könnten, was die Ergebnisse verfälschen könnte (Winkhaus 1954).

Die in der Abbildung 6 für Ocy 1 zugrunde gelegten Werte wurden unmittelbar nach der Blutentnahme bestimmt, die für Olaf 3 verwerteten Daten entstammen einem Test.

Auffallend ist, daß ein fast exponentieller Anstieg des Titers von Ocy 1, welcher nach einem halben Jahr einen Höhepunkt erreicht, nicht auf einem Plateau bleibt, son-

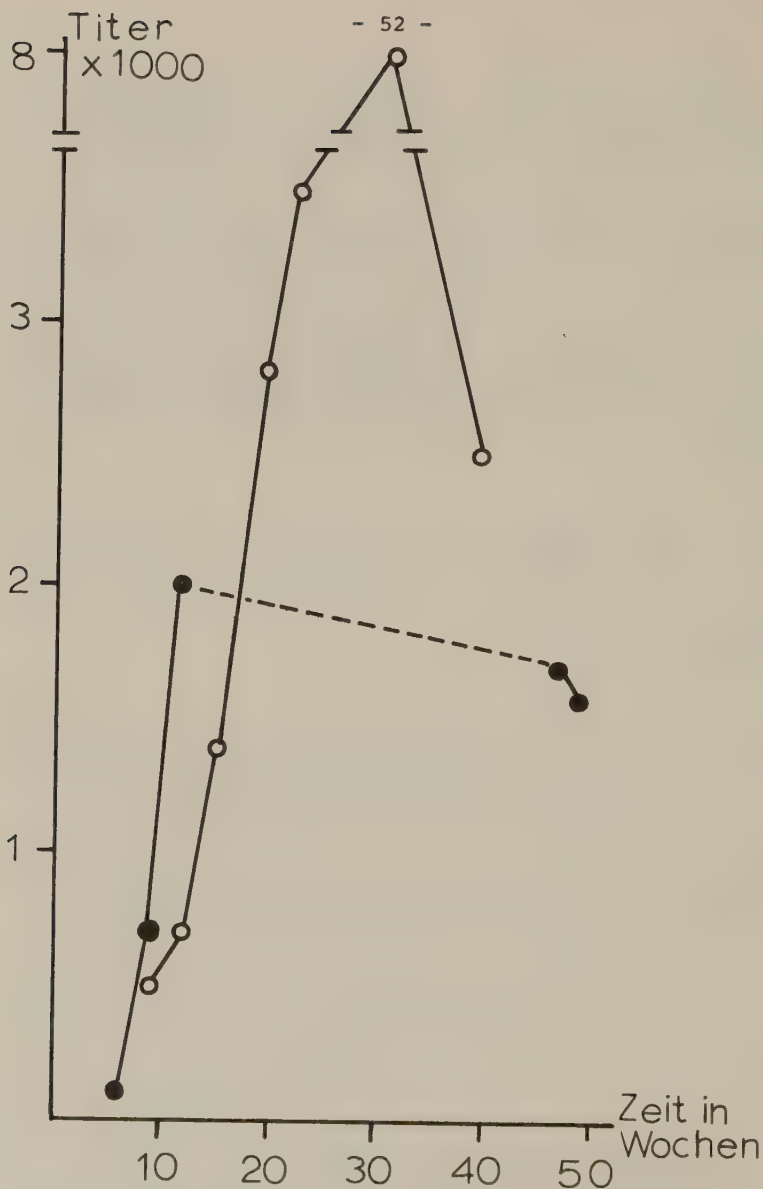


Abb. 5: Entwicklung der Antiseratiter von Ocy 1 (○—○) und Olaf 3 (●—●). Wegen Fehlens von Proben wurde bei Olaf 3 die Linie nicht immer durchgezogen.

dern nach 3 Monaten wieder abfiel. Ich muß noch einmal darauf verweisen, daß nach jeder Blutentnahme auch erneut geboostert wurde. Die Serumproben von Olaf 3 waren im fraglichen Zeitraum hämolytisch.

3.2 Markierung

3.2.1 Markierung mit Chloramin T

Als Beispiel einer Markierung möchte ich die vom 7.8.74, Nr. 10 herausgreifen.

Die Gesamtaktivität des Na^{125}J betrug bei
20 cm Abstand vom Zählrohr 672.480 Imp./20 sec

Nach der durchgeführten Markierung hatte
0,1 ml der Lösung bei 20 cm Abstand 3.127 Imp./20 sec

Bei einem Abstand von 0 cm hatte die-
selbe Probe 148.392 Imp./20 sec

eine zweite Probe hatte 152.729 Imp./20 sec

Nach der Zugabe des Dowex hatten
0,1 ml bei einem Abstand von 0 cm
einmal 134.469 Imp./20 sec
und einmal 137.535 Imp./20 sec

Der Leerwert des Zählers betrug 841 Imp./20 sec.

Die Zugabe des Dowex nach der Markierung führt zu einer Verminderung der Aktivität im Aliquot. Die Abnahme beträgt etwa 10 %. Die Abb. 6 macht deutlich, daß die Abnahme der Aktivität durch eine Abnahme des freien Jodanteils bewirkt wird. Es handelt sich hier um die Markierung Nr. 2, in diesem Fall betrug der Anteil des freien Jod etwa 30 % der Gesamtaktivität.

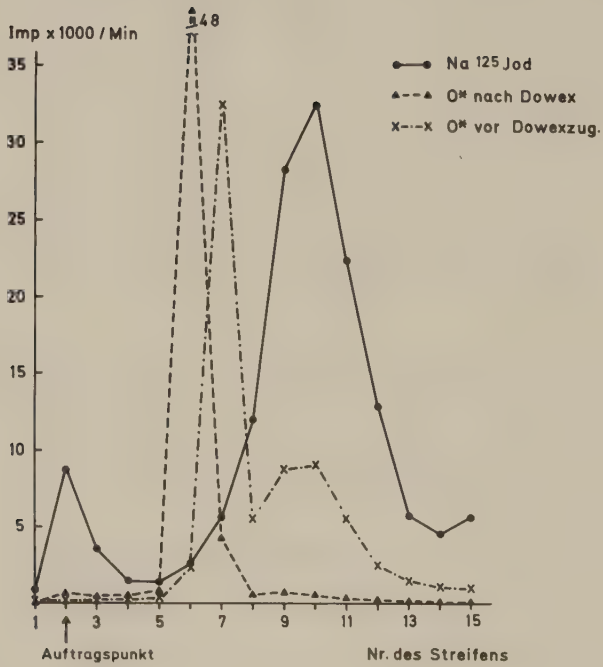


Abb. 6: Elektrophorese von markiertem Ocytocin vor und nach der Zugabe von Dowex. Zum Vergleich ist Na¹²⁵J ebenfalls mit aufgetragen worden.

Vor der Verwendung des markierten Hormons wurde jeweils ein wenig Dowex (einige Körnchen) zugegeben, um eventuell frei gewordenes Jod abzufangen, welches sonst eine höhere Aktivität vortäuschen würde.

Es hat sich als Erfahrungswert gezeigt, daß ältere Markierungen, die mehr als 3 Wochen tiefgefroren waren, dann noch unbedenklich für einen Test eingesetzt werden konnten, wenn sie nach der erneuten Dowexzugabe noch wenigstens mit 15 Teilen Puffer verdünnt werden konnten, um eine Aktivität von knapp 10.000 Imp./Min. im Gammazähler (Wallac) zu erhalten. Normalerweise lag die Markierungsausbeute bei 80 - 90 %, gemessen an der vor und nach der Zugabe von Dowex gemessenen Aktivität. Es traten jedoch vereinzelt wesentlich schlechtere Markierungen auf, welche aber ohne erkennbare veränderte Bedingungen durchgeführt worden waren. Die Abnahme der Aktivität betrug in diesen Fällen etwa 50 - 60 %. Solche Markierungen konnten im Test nicht verwendet werden.

3.2.2 Markierung mit Laktoperoxydase

Die Markierung von Ocytocin mit Laktoperoxydase wurde aus zwei Gründen durchgeführt: Zum einen interessierte, ob damit bessere Ergebnisse im Test zu erzielen seien, zum anderen sollte die Frage einer Selbstmarkierung der Laktoperoxydase geklärt werden. Markiert man FSH mit Laktoperoxydase, so wird eine eventuelle Markierung derselben dadurch verdeckt, daß beide Proteine ein Molekulargewicht von ca. 30.000 haben. Sie sind mit einer Sephadex G 50 Säule nicht zu trennen. Aus diesem Grund folgte nach der Markierung des Ocytocins als erstes eine Reinigung über Sephadex G 50 und erst dann wurde in die Gläser, in welchen das Ocytocin vermutet wurde, Dowex gegeben. In Tabelle IV habe ich die in den Gläsern 1 -24 gemessene Aktivität dargestellt.

Glas Nr.	Aktivität	Glas Nr.	Aktivität
1	786	13	54.214
2	775	14	82.963
3	728	15	85.804++
4	699	16	54.442
5	879	17	28.092
6	1.402++	18	12.326
7	1.190	19	5.365
8	1.057	20	2.724
9	1.735	21	1.559
10	3.831	22	1.237
11	10.764	23	924
12	26.323	24	941

Tab. IV: Aktivität gemessen in den Gläsern 1 - 24 nach Laktoperoxydasemarkierung und anschließender Reinigung über Sephadex G 50 (jeweils 1 ml Eluat). Die Aktivität ist in Imp./20 sec angegeben; sie wurde bei 20 cm Meßabstand mit einem Berthold-Zähler gemessen. Die mit ++ gekennzeichneten Gläser sind innerhalb einer Gruppe die Eluate mit höchster Aktivität.

Die Gläser 9 - 18 wurden zusammengefaßt und durch Zugabe von Dowex gereinigt. Es trat durch die Dowexzugabe keinerlei Abnahme der Aktivität ein (jeweils knapp 60.000 Imp. pro 20 sec vor und nach der Zugabe). Es fällt im Elutionsbild auf, daß im Glas 6 eine erhöhte Aktivität auftritt. In diesem Glas findet sich bei einer FSH-Markierung das markierte Hormon. Die Markierung wurde elektrophoretisch überprüft, das Bild entsprach dem der Chloramin-Markierung.

3.2.3 Elektrische Markierung

Als Versuchsbeispiel möchte ich die Markierung vom 4.6.75 anführen.

Der Ansatz im Anodenraum, dem Platintiegel war:

0,05 ml Na¹²⁵J

0,05 ml Ocytocin

0,3 ml NaCl-Lösung (10 mg/ml)

1,0 ml Kaliumjodidlösung 10^{-4} M

Der Kathodenraum, in dem sich der Platindraht befindet, wurde mit 1,5 ml NaCl-Lösung gefüllt.

Die Markierung wurde bei einer angelegten Spannung von 750 mV über 90 Minuten durchgeführt. Nach 15, 30, 45, 60, 75 und 90 Minuten wurden Aliquote entnommen und deren Aktivität gezählt; nach Versuchsende wurden die Proben papieroelektrophoretisch überprüft. In Abb. 7 sind die Ergebnisse nach 15, 30 und 90 Minuten eingezeichnet.

Der das markierte Ocytocin darstellende Gipfelwert hat seinen Höhepunkt bereits nach 15 Minuten erreicht. Er nimmt in der Folge stetig zu Gunsten des Jodgipfels ab.

Der Ansatz mit Antikörper erbrachte mit der nach 90 Minuten vorhandenen Lösung keine Bindung.

3.3 Inkubation

3.3.1 Temperatur

Die Austestung der Antikörper erfolgte in der Regel bei Zimmertemperatur über einen kürzeren Zeitraum. Da aus den ersten Versuchen hervorging, daß die Doppelwerte nach dieser Inkubation sehr starken Schwankungen unterlagen, habe ich in der Folgezeit die weiteren Untersuchungen bei Kühlschranktemperatur durchgeführt.

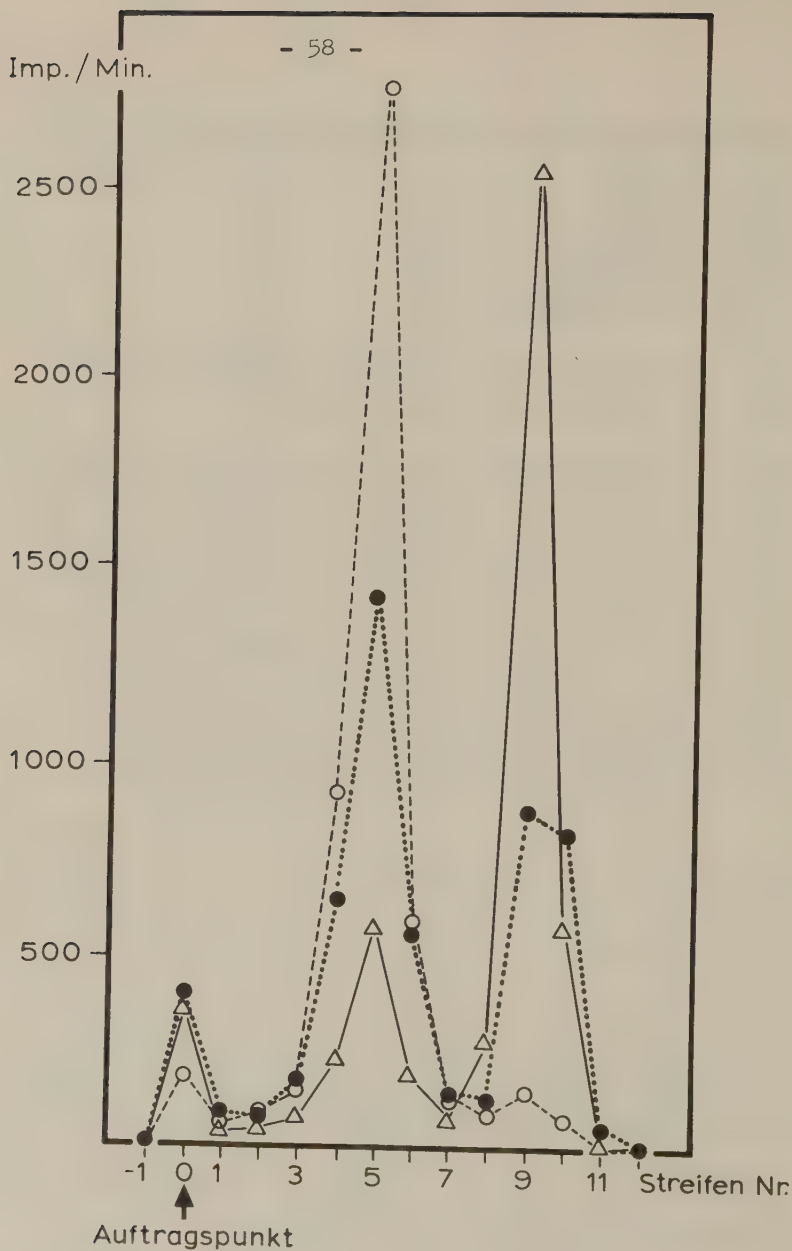


Abb. 7: Elektrophorese nach elektrischer Markierung
nach 15 (○), 30 (●) und 90 (△) Minuten
Versuchszeit

3.3.2 Inkubationszeit

Zwei Fragen sollten bei dieser Untersuchung geprüft werden, es ging einmal darum, ob die Vorinkubation einen Einfluß hat, zum anderen ob das markierte Hormon 24 oder 48 Stunden nachinkubieren sollte. 14 Standardkurven wurden angesetzt. Diese wurden in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe wurde 24 Stunden nach Zugabe von markiertem Hormon ausgewertet, die andere 48 Stunden danach. Das markierte Hormon selbst wurde 1 - 7 Tage nach Ansatz des Testes zu den jeweiligen Standards zupipettiert. Abbildung 8 und Abbildung 9 zeigen die Resultate einiger dieser Standardkurven.

Bei Abb. 8 sieht man, daß ein Tag Vorinkubation zu einer Standardkurve führt, deren Empfindlichkeit bei ca. 64 pg beginnt. Fünf Tage später ist die Kurve dann wesentlich empfindlicher. Eine weitere Steigerung der Vorinkubationszeit macht sich nicht mehr in einer höheren Empfindlichkeit bemerkbar, die Kurve fällt nur noch ein wenig steiler ab und erscheint etwas gleichmäßiger. Wesentlich anders ist das Bild, wenn erst 48 Stunden nach der Zugabe des markierten Hormons ausgewertet wird (Abb. 9): Die Kurve nach einem Tag Vorinkubation wirkt sehr stabil, liegt aber mit einer Empfindlichkeit ab 32 pg über der notwendigen Anforderung. Eine Verlängerung der Inkubation führt zu einer Abnahme der Stabilität, je länger vorinkubiert wird, desto mehr Punkte fallen aus der kontinuierlichen Linie heraus. Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen konnte ein Einfluß der Inkubationszeit auf die absolute Bindung und den bei der Auswertung mit Ammoniumsulfat erhöhten Leerwert nicht konstatiert werden. Die Bindung betrug 18 - 28 %, der Leerwert bewegte sich zwischen 18 und 28 % Bindung und wurde bei Darstellung der Kurven bereits abgezogen.

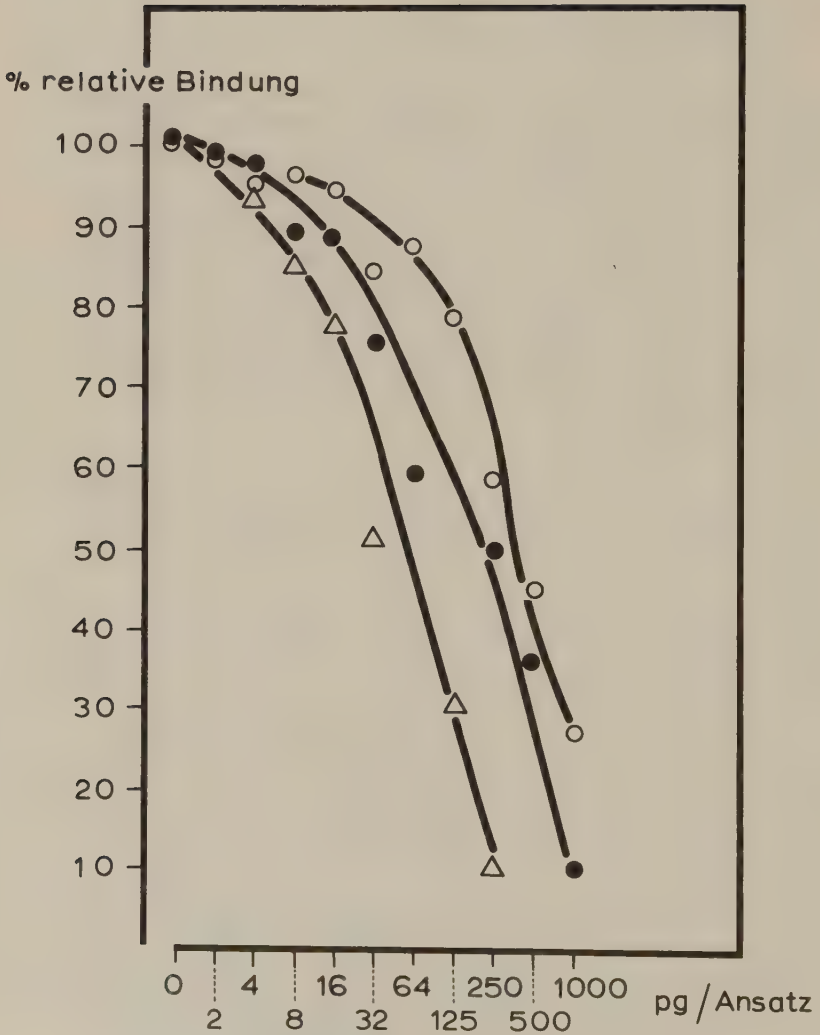


Abb. 8: Standardkurven von Oxytocin.
Zugabe des markierten Hormons 24 Stunden
vor der Trennung von freier und gebundener
Phase. Vorinkubation 1 (○), 5 (●) und 7 (△)
Tage.

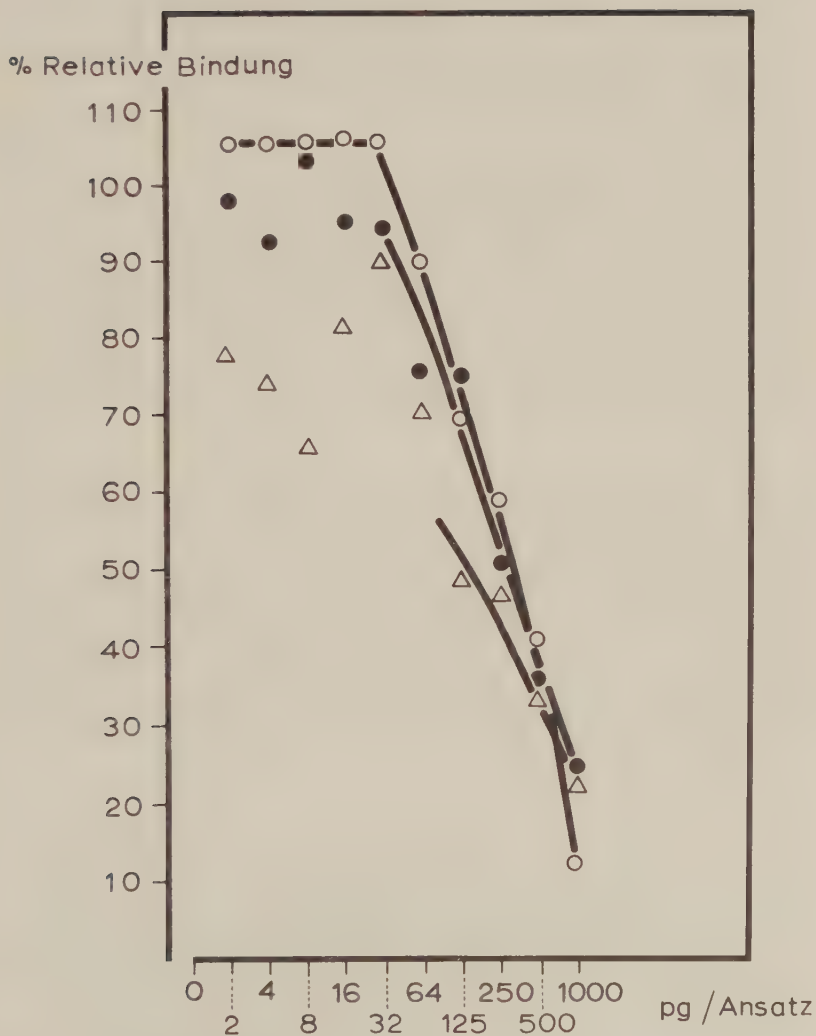


Abb. 9: Standardkurven von Oxytocin. Die Zugabe des markierten Hormons erfolgte 48 Stunden vor der Trennung von freier und gebundener Phase. Vorinkubation 1 (○), 5 (●) und 6 (△) Tage.

3.4 Trennverfahren

Die Trennung von freier und gebundener Phase erfolgte in der Hauptsache durch zwei Methoden: durch Ammoniumsulfat und durch eine Kombination von zweitem Antikörper mit Ammoniumsulfat.

Chard et al. (1970a) bedienten sich der Ammoniumsulfatmethode. Sie empfehlen, zur Sichtbarmachung des Präzipitates 10 μ l einer selbstgefertigten Gammaglobulinlösung hinzuzufügen. Die Methode wurde bei der Trennung von Antikörperverdünnungsreihen naturgemäß als erstes versucht. Die Leerwerte (Ansatz ohne Antikörper) waren unverhältnismäßig hoch, sie lagen über 20 % absoluter Bindung.

In der Folgezeit habe ich versucht, diese hohen Leerwerte zu drücken. Als erstes habe ich die Gammaglobulinlösung mit Puffer verdünnt und konnte teilweise mit Leerwerten um 12 % arbeiten. Leider war dieser Effekt nicht konstant. Daraufhin habe ich, da ich in der Zwischenzeit mit der Arbeitsmethode vertraut war und kein sichtbares Präzipitat mehr benötigte, ganz auf die Zugabe von Gammaglobulinlösung verzichtet. Es trat keine Verringerung des Leerwertes mehr ein.

Durch eine Trennung der Phasen mit Hilfe eines zweiten Antikörpers hoffte ich dieses Problem zu lösen. In einem Versuch setzte ich 42 Antikörperverdünnungsreihen an, die ich mit steigenden Konzentrationen von zweitem Antikörper und abnehmenden Konzentrationen von präzipitatisförderndem Gammaglobulin auszuwerten versuchte. Es deutete sich an, daß eine Auswertung ohne zugesetztes Gammaglobulin bei verhältnismäßig hoher Konzentration des zweiten Antikörpers möglich sein müßte.

Zahlreiche Versuche, Standardkurven auf diesem Weg auszuwerten, mißlingen. Man weiß, daß die Zugabe von Ammoniumsulfat (1 M Endkonzentration) unter Umständen geringere Mengen von 2. Antikörper für die Ausfällung der gebundenen Phase erfordert. Im Rahmen meiner Untersuchungen erhoffte ich, überhaupt eine Präzipitation des gebundenen Komplexes zu erreichen. Aus Abb. 10 ist ein Vergleich der von mir geschilderten 3 Methoden zu ersehen (wider Erwarten konnte auch mit dem zweiten Antikörper allein ein Ergebnis erzielt werden). Der Ansatz war für die Standardkurven identisch.

Der zweite Antikörper wurde in einer Endverdünnung von 1 : 28 verwendet. Ammoniumsulfat wurden 50 µl einer gesättigten Lösung zugegeben.

Die Leerwerte betrugen:

Ammoniumsulfat	5413 Imp./Min.	=	33 % abs. Bindung
2. Antikörper	153 Imp./Min.	=	~ 1 % " "
2. Antikörper + Amms.	182 Imp./Min.	=	~ 1 % " "

Die absolute Bindung betrug ohne Leerwerte

Ammoniumsulfat	37 % abs. Bindung
2. Antikörper	18 % " "
2. Antikörper + Amms.	33 % " "

Die höchste Bindung wurde demnach mit Ammoniumsulfat erreicht, allerdings streuen hier die Werte so stark, daß einige nicht im Kurvenverlauf unterzubringen sind.

Sehr gleichmäßig sieht die Kurve aus, wenn der zweite Antikörper allein eingesetzt wird. Die Bindung liegt um etwa die Hälfte niedriger als bei der Ammoniumsulfatmethode.

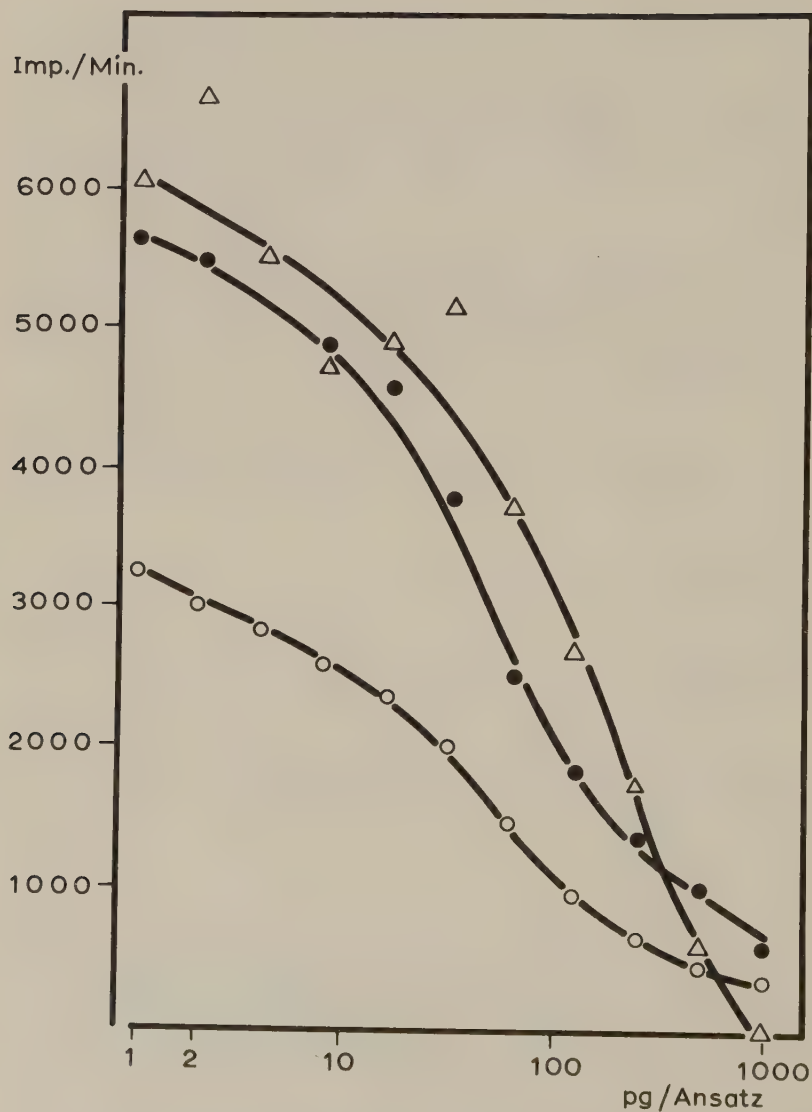


Abb. 10: Vergleich verschiedener Trennmethode

Δ = Ammoniumsulfat

● = 2. Antikörper mit Ammoniumsulfat

○ = 2. Antikörper allein

Die Bindung, die bei Anwendung der Kombinationsmethode erreicht wird, ist fast so hoch, wie die bei der Anwendung von Ammoniumsulfat allein. Ein Punkt der Standardkurve ist nicht im Kurvenbild unterzubringen.

3.5 Extraktion

3.5.1 Spherosil (Wiederfindung von mark.Hormon, im RIT und im Biotest)

Als erstes habe ich versucht, nach der von Boyd et al. (1972) beschriebenen Methode zu extrahieren.

Ich habe hierbei überprüft, ob durch Steigerung der zuzugebenden Menge an Spherosil mehr von dem dem Extrakt zugegebenem markiertem Ocytocin wiedergefunden werden kann. Zu 2 ml Plasma habe ich 100, 200, 250, 300, 350 und 400 mg Spherosil gegeben und die Proben dann nach der oben geschilderten Methode verarbeitet. Die folgende Übersicht zeigt die Wiederfindung des markierten Hormons in 2 Versuchen:

Zugabe Spherosil mg	100	150	200	250	300	350	400
1. Versuch							
Wiederfindung in %	67,6	67,9	62,8	62,4	76,9	60,5	73,1
2. Versuch							
Wiederfindung in %	67,0	68,7	69,2	67,7	66,8	94,8	71,2

Eine Steigerung der Spherosilmenge erhöht nicht die Wiederfindung von markiertem Ocytocin. In einem weiteren Versuch wurden zu 141 Plasmaproben von drei verschiedenen Tieren je 100 mg Spherosil gegeben und die Wiederfindung mit markiertem Ocytocin überprüft.

Bei Tier 1 betrug die Wiederfindung	63,9 % $\pm$ 15,6 (n=28)
bei Tier 2	60,3 % $\pm$ 6,2 (n=60)
bei Tier 3	50,0 % $\pm$ 8,4 (n=53)
insgesamt (n = 143)	57,0 % $\pm$ 11,9*

Man sieht, daß sowohl beim Einzeltier, als auch bei den Tieren untereinander große Schwankungen auftreten. Der niedrigste Wiederfindungswert betrug 29,1 %, der höchste lag bei 124 %. Als nächstes versuchte ich nun diese Methode zur Extraktion von nicht markiertem Hormon aus dem Plasma einzusetzen und sowohl endogenes als auch zugesetztes Hormon zu messen. Dies gelang nicht, es waren keine reproduzierbaren Ergebnisse zu erhalten. Die Ursache vermutete ich in einem unspezifischen, über das Spherosil mit extrahiertem Faktor. Zur "Überdeckung" habe ich sowohl zum Standard, als auch zu einigen aus Bullenserum gewonnenen Extrakten, denen steigende Mengen kalten Hormons zugesetzt worden war, 10 µl Bullenserum bei Inkubationsbeginn zugesetzt.

Wie aus Abb. 11 hervorgeht, konnten Kurven erstellt werden. Man sieht, daß die Extraktionskurve über der Standardkurve liegt. Bei höherer Konzentration des zugegebenen Hormons fallen beide Kurven deutlich ab, im niederen Konzentrationsbereich schwanken die extrahierten Werte deutlich, die Doppelproben stimmen dabei jedoch gut überein (aus der Abbildung nicht zu ersehen).

Den Rest des Extraktes hatte ich bei diesem Versuch erneut mit Puffer verdünnt, zur Aufnahme des Extrakts werden 250 µl ins Glas pipettiert, davon 200 überführt, um zu sehen, ob die störenden Substanzen dadurch eliminierbar seien. Dieser Weg führte zu keinem Ergebnis: die Werte streuten undefinierbar im Bereich der maximalen Bindung.

* Es ist jeweils die Standardabweichung mit angegeben.

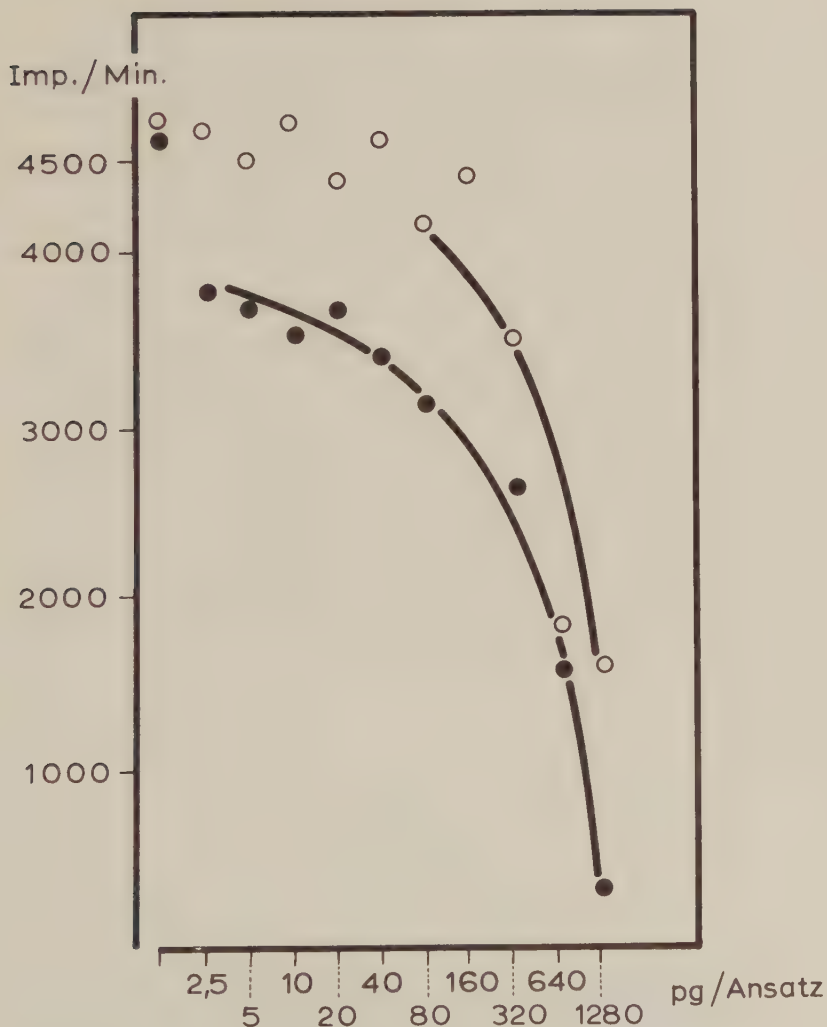


Abb. 11: Standard und Extrakt von Oxytocin. Während der Inkubation waren 10 μ l Bullenserum zugegeben.
 ○ = Extrakte
 ● = Standardkurve

Zur Kontrolle der Extraktionstechnik hatte ich Gelegenheit mittels des unter 1.3.1.1 beschriebenen biologischen Tests Spherosilextraktionen zu überprüfen*. Ich verwendete dazu Bullenplasma, das einmal gewonnen und in Portionen bis zum jeweiligen Versuch tiefgefroren worden war. Zu 4,9 ml Plasma wurden 100 μ U Ocytocin in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung gegeben und dann nach 2.6.1 extrahiert. Da auch Gelegenheit bestand, einen biologischen Test für Vasopressin durchzuführen, dessen Handhabung wesentlich einfacher als die des Ocytocinbiotests ist, habe ich auch einige Extrakte nach dieser Methode (modifiziert nach Dicker 1953) überprüft. Auf den Test selbst möchte ich an dieser Stelle nicht eingehen, die Extraktionsmethode für den Test unterscheidet sich nur soweit, daß das Vasopressin durch zwei Acetonextraktionen vom Spherosil gelöst werden muß, um vergleichbare Wiederfindungsraten zu erhalten. Dem Plasma wurden entsprechend wie beim Ocytocin 100 μ U/5 ml zugegeben.

Die Wiederfindungen waren wie folgt:

* Für die Arbeitsmöglichkeit im Labor von Dr. M.L. Forsling gilt Prof. Dr. E. Neil, Dept. of Physiol., Medical School, University of London mein besonderer Dank.

Versuch Nr.	Wiederfindung Ocytocin in %	Wiederfindung Vaso- pressin in %
1	52,5	61,0
2	45,0	52,0
3	65,0	60,0
4	60,0	50,0
5	70,0	62,0
6	-	59,0
Durch- schnitt aus 5 bzw. 6 Ver- suchen	58,5	57,3

Man sieht, daß die durchschnittliche Wiederfindung bei etwa 58 % liegt, die Extremwerte aber mit einem Minimum von 45 % und einem Maximum von 70 % doch eine Schwankungsbreite von 25 % aufweisen. Die Versuche 1 und 2 jeder Gruppe wurden in einem Test überprüft, die anderen Versuche jeweils in aufeinander folgenden Tests. Man kann erkennen, daß Schwankungen sowohl innerhalb eines Tests als auch zwischen Tests auftreten.

Es muß noch hinzugefügt werden, daß bei mehreren Versuchen das Rinderplasma nach Zugabe des HCl gelierte und dann nicht mehr weiter zu verarbeiten war. Ohne Ansäuerung des Plasmas lag die Wiederfindung von markiertem Hormon bei 25 - 30 %.

3.5.2 Andere Adsorbentien

Zusätzlich zu den Extraktionsversuchen mit Spherosil wurde versucht, mit anderen Materialien das Ocytocin aus dem Plasma zu extrahieren. Florisil, Fullererde, Bentonit, Kieselgel und anderes Glasadsorbens wurden untersucht. Die Extraktion wurde ähnlich der für Spherosil beschriebenen Arbeitsweise durchgeführt. Die Adsorbentien wurden mit und ohne Ansäuerung überprüft. Die meisten Versuche stellte ich nach Voruntersuchungen ein, da keine genügend hohe Ausbeute erreicht wurde. Mit Florisil fand ich 6,9 % des zugesetzten markierten Hormons, 10 Untersuchungen mit Fullererde brachten Wiederfindungen von 10 - 25 %.

Bentonit erbrachte bei steigend zugesetzten Mengen von 6 - 24 mg Wiederfindungsraten von 20 - 25 % markiertes Hormon.

3.5.3 Extraktion mit Methanol

Zu 1 ml Bullenplasma gab ich markiertes Hormon, ca. 20.000 Imp./Min. ($\approx$ 15 - 20 pg Ocytocin), dazu kamen 4 ml bzw. 3 ml Methanol. Die Plastikröhrchen wurden nun verschlossen und fünf Minuten über Kopf gedreht. Anschließend wurden sie für kurze Zeit zentrifugiert, der Überstand in andere Röhrchen gekippt und in diesen niedergetrocknet.

Der Extrakt wurde in 220 μ l Puffer aufgenommen und davon je 100 μ l in ein Teströhrchen mit einer Eppendorfpipette überführt. Die Teströhrchen wurden nun im Gammazähler gezählt. Es wurden je 11 Proben angesetzt.

Die Proben, denen 4 ml Methanol zugesetzt worden war, hatten 70,4 % des zugesetzten Ocytocins im Extrakt ($s = \pm 5,3$), die mit 3 ml Methanol enthielten 67,2 % $\pm 9,3$.

Für die folgenden Untersuchungen wurden immer 4 oder 5 ml Methanol verwendet.

Bei einigen Proben war nach dem ersten Extraktionsschritt eine leichte Gelbfärbung des Extraktes zu sehen. Ich wollte versuchen, diesen Farbton zu eliminieren, um eventuelle Störfaktoren von vornherein zu vermeiden.

Petroläther nimmt Ocytocin nicht in Lösung, aber lipophile Substanzen. Ich setzte ihn einmal dem Plasma vor der Extraktion mit Methanol, ein anderes Mal nach der Extraktion zu. In ersterem Fall fror ich die Probe aus und setzte erst dann, nach dem Abkippen des Petroläthers, das Methanol zur Probe und führte die Extraktion durch. Im zweiten Fall extrahierte ich wie oben beschrieben, trocknete nieder, nahm in Aceton auf und versuchte dann eine Lösungsmittelverteilung mit Petroläther. Der Petroläther wurde dann verworfen und die Probe erneut niedergetrocknet.

Für einen ersten Überblick überprüfte ich extrahiertes, markiertes Material in einer Elektrophorese. Abb. 12 zeigt, daß immer, wenn Petroläther mit eingesetzt wurde, ein zusätzlicher Gipfelwert auftrat, der nicht dort zu finden war, wo normalerweise das freie Jod gefunden wird (gekennzeichnet durch einen Pfeil in der Abbildung). Die Extraktion mit Methanol allein zeigte das gewohnte elektrophoretische Erscheinungsbild.

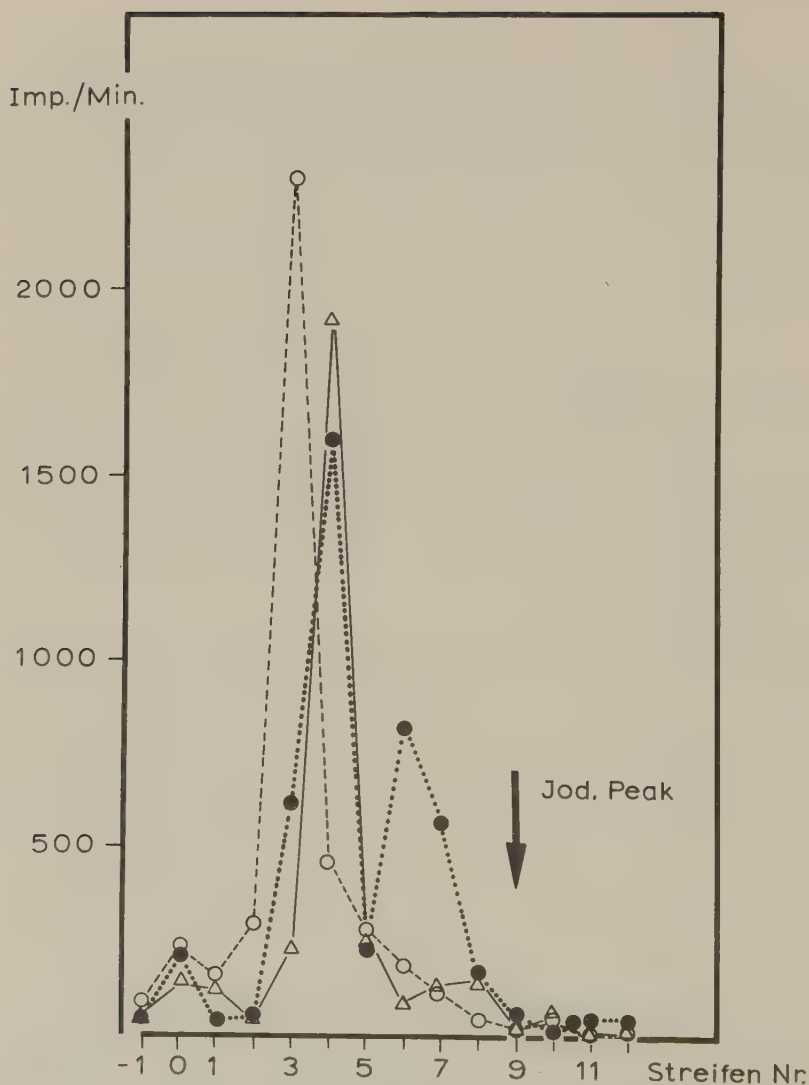


Abb. 12: Elektrophorese von markiertem Oxytocin nach Extraktion mit Lösungsmitteln

○ = Methanol

△ = Methanol, anschließend Petroläther

● = "Vorreinigen" mit Petroläther

In weiteren Versuchen wollte ich die Extrakte im Test wiederfinden. Ich setzte einmal synthetisches Ocytocin zu, zum anderen überprüfte ich, wie sich eine Verdünnungsreihe eines Testplasmas im System verhält. Das Ergebnis des Zusatzversuches ist in Abb. 13 dargestellt. Wegen der weiten Streuung sind die Einzelwerte der Extraktion und nicht die Mittelwerte dargestellt.

Die Werte der Verdünnungsreihe wurden wegen der großen Streuung nicht mit eingetragen. Ein gleichartiger Versuch wurde noch einmal durchgeführt und erbrachte die gleichen ungünstigen Resultate.

3.5.4 Extraktionsversuche mit Aceton

In einem Vorversuch hatte ich Plasma mit der 10-fachen Menge von Aceton versetzt, das ganze auf dem "Vortex" kräftig geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Im Überstand sollte sich das in Lösung befindliche Ocytocin befinden. Eine Überprüfung mit markiertem Material zeigte jedoch, daß der Hauptanteil des Ocytocins mit im Sediment zu finden war. Der Überstand erbrachte nach Niedertrocknen etwa 15 - 20 % Wiederfindung.

Kurz vor Abschluß dieser Arbeit machte ich einen erneuten Versuch mit Aceton. Ich setzte das Aceton in ein Eisbad und gab es tropfenweise zu einem ml Plasma, und zwar insgesamt 5 ml unter ständigem Rühren. Nach dem Zentrifugieren reinigte ich die Acetonlösung mit dem gleichen Volumen Narkoseäther und trocknete dann den Extrakt bei Zimmertemperatur unter Stickstoff nieder. Unter diesen Bedingungen fand ich knapp 70 % des "heißen Hormons" im Extrakt wieder. In einem abschließenden Test wurden zu einem ml Plasma bekannte Mengen an kaltem synthetischem Hormon gegeben. Das Ergebnis der Auswertung zeigt Abb. 14. Die Werte nach Zusatz liegen deutlich unter der Standardkurve. Die Wiederfindung der zugesetzten Werte bewegte sich zwischen 100 und 230 %.

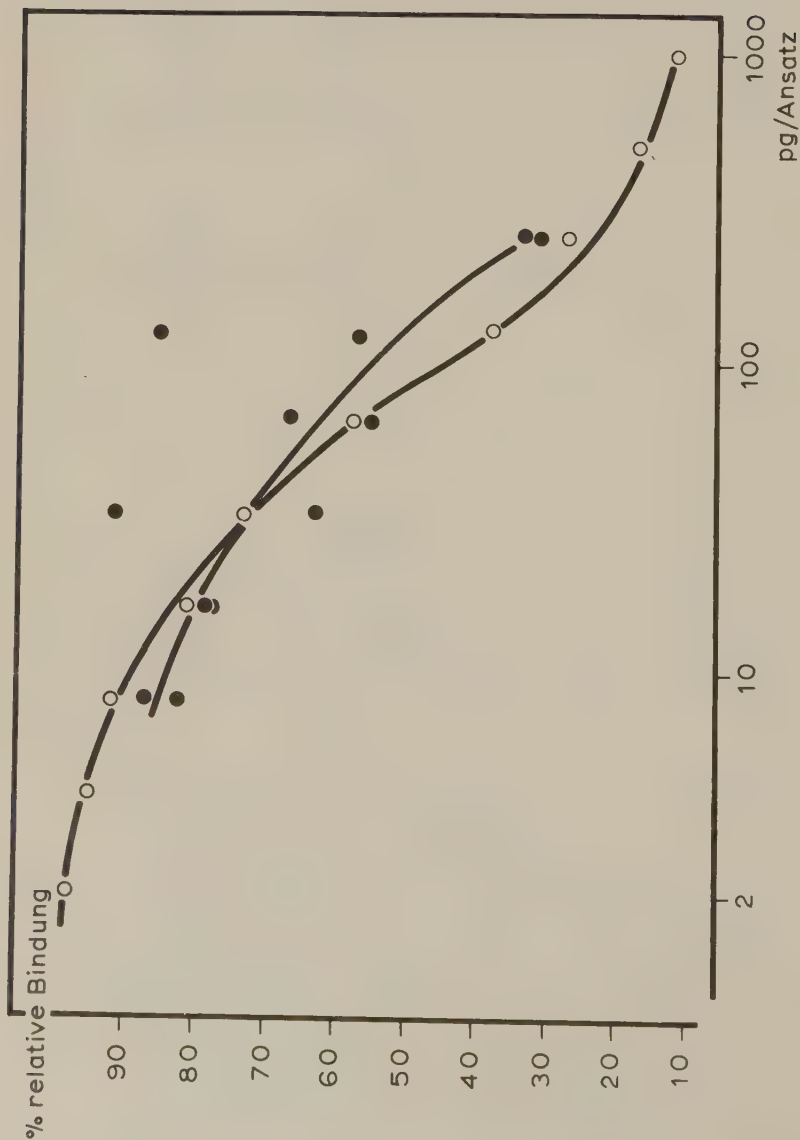


Abb. 13: Vergleich Standardkurve Oxytocin (○) mit aus Methanolextrakt gewonnenen Werten (●)

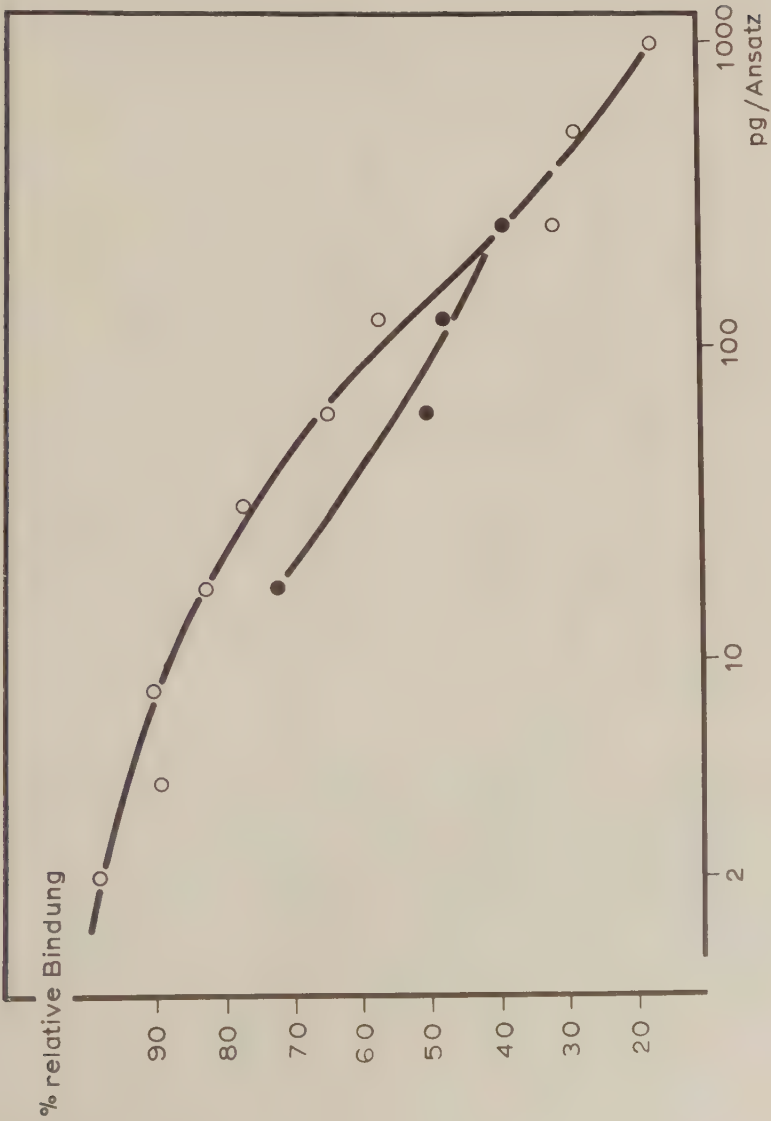


Abb. 14: Vergleich Standardkurve Ocytocin (○) mit aus Acetonextraktion gewonnenen Werten (●)

3.6 Erstellen von Standardkurven von Ocytocin, Kreuzreaktionen mit anderen Peptidhormonen

Die beiden Antisera Ocy 1 und Olaf 3, die sich als potent erwiesen hatten, radioaktiv markiertes Hormon zu binden, wurden für die Erstellung von Standardkurven und zur Überprüfung auf Kreuzreaktionen mit Lysin-Vasopressin und Arginin-Vasopressin herangezogen.

3.6.1 Antiserum Ocy 1

Die Standardkurve wurde mit dem Antiserum vom 25.3.74 mit einer Endverdünnung von 1 : 6000 erstellt. Die Vorinkubation betrug 5 Tage, die Auswertung erfolgte mit Ammoniumsulfat. Aus der Abb. 15 ist zu entnehmen, daß die Kreuzreaktion mit Arginin-Vasopressin schwach, mit Lysin-Vasopressin, welches allerdings nur beim Schwein endogen zu finden ist, deutlich in Erscheinung tritt.

Die Standardkurven von Ocy 1 zeigten häufig einen Wiederanstieg der Kurve im Bereich 16 - 64 pg, was mich veranlaßte, durch Zusatz von 30 pg zu versuchen, diesen Anstieg zu umgehen. Es gelang nur in Ausnahmefällen.

3.6.2 Antiserum Olaf 3

Abb. 16 zeigt die Standardkurve, die mit dem Antiserum des Kaninchen Olaf 3 aufgestellt werden konnte. Kreuzreaktionen traten bis zu einer Konzentration von 10.000 pg/Ansatz für keines der Vasopressine auf. Zu diesem Test wurde das Antiserum in einer Verdünnung von 1 : 2000 verwendet. Die Auswertung erfolgte mit einem zweiten Antikörper und Ammoniumsulfat.



Abb. 15: Standardkurve Ocy 1 (○) Kreuzreaktion mit AVP (Δ) und IVP (●)

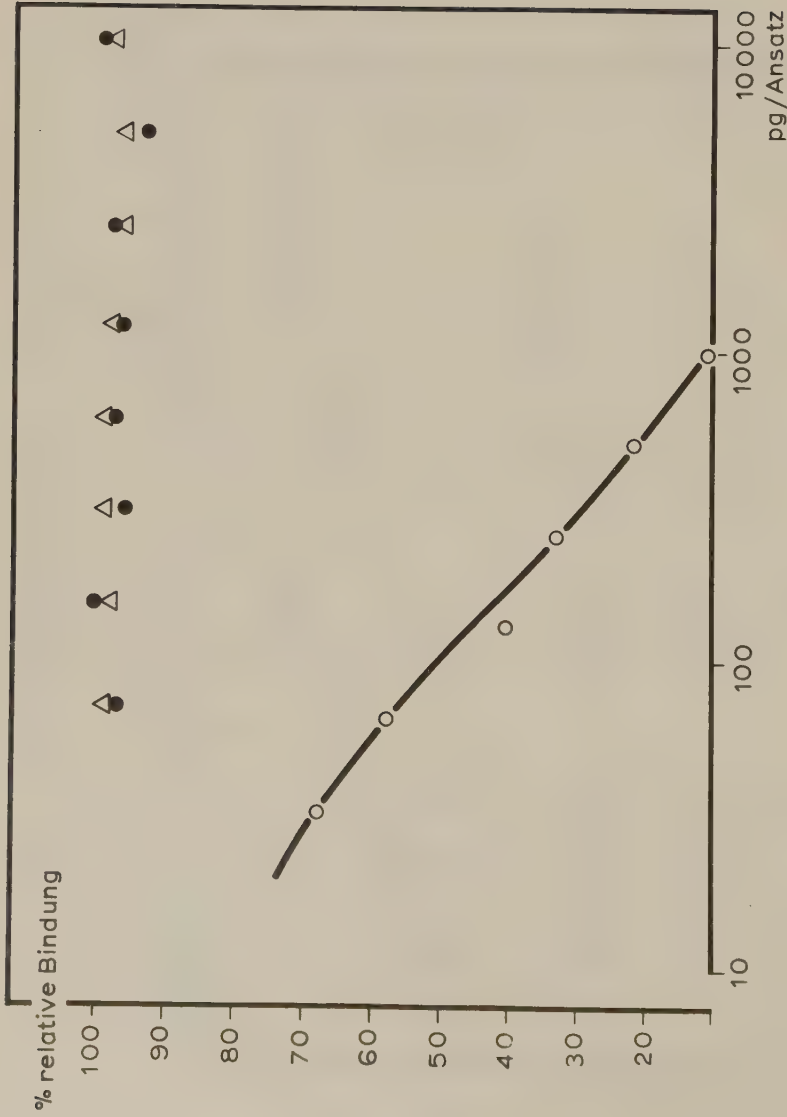


Abb. 16: Standardkurve Olaf 3 (o)
Kreuzreaktion mit AVP (Δ) und LVP (●)

Da ich zu diesem Versuch nicht in den sehr empfindlichen Bereich der Standardkurve vordringen wollte, verkürzte ich die Inkubationszeit. Das Antiserum stammt vom 28.1.75.

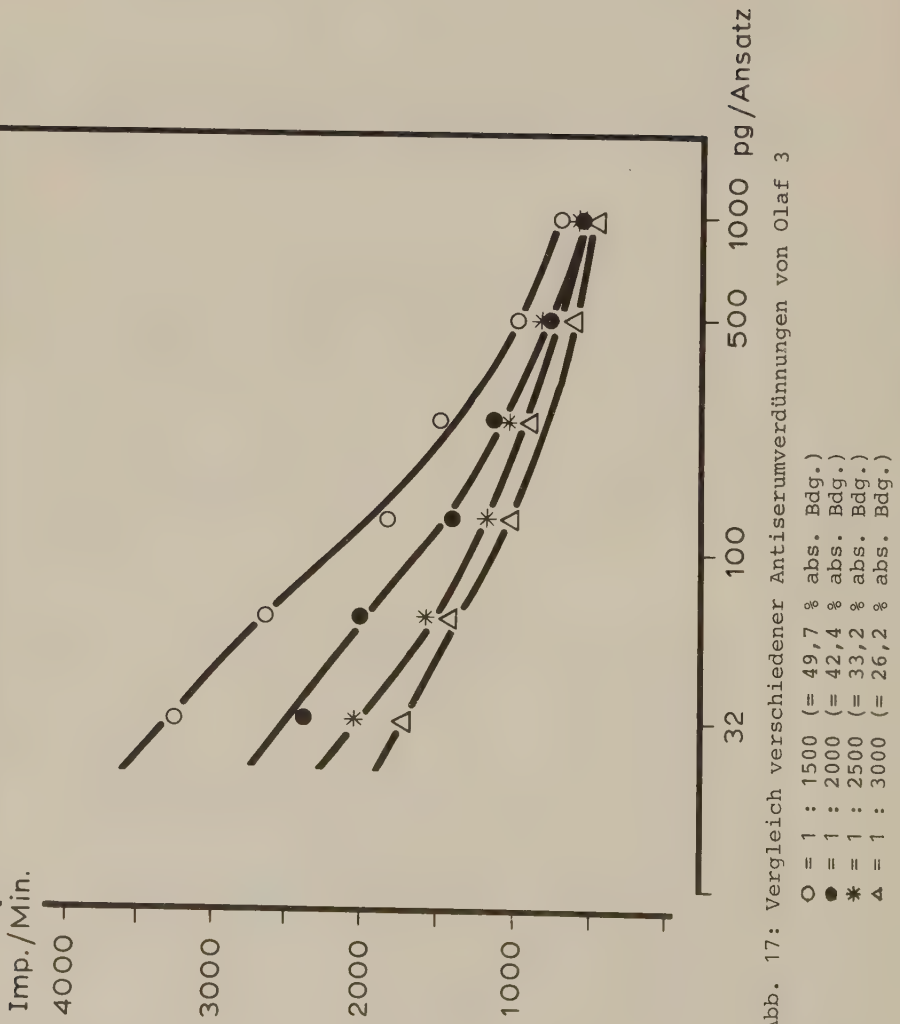
Die Standardkurven zeigen den bei Ocy 1 erwähnten Anstieg nicht. Sie waren gut reproduzierbar, die absolute Bindung des Serums nahm jedoch in letzter Zeit ab.

Der Einfluß der Verdünnung des Antiserums auf den Test wurde an diesem Antiserum untersucht (Abb. 17). Die absolute Bindung nimmt mit zunehmender Verdünnung ab, die einzelnen Werte sind aber bei allen Kurven eindeutig voneinander abzugrenzen.

Abbildung 18 stellt eine Standardkurve dar, welche nach einer Gesamtinkubation von 7 Tagen ausgewertet wurde.

3.7 Auswertung von Tests mit dem Kleincomputer, Vergleich mit anderen Methoden

Als Vergleichsmaßstab für die Beurteilung der eigenen Berechnungsmethode habe ich die Handauswertung gewählt. Zusätzlich habe ich die zum Vergleich herangezogenen Tests nach dem Programm von Rodbard et al. (1968) berechnet und auch mit der Handauswertung verglichen. Die Abweichungen werden im Prozentsatz des jeweils aktuellen Wertes angegeben, sind also nicht von einer dritten Größe (z.B. absol. Bindung) abhängig.



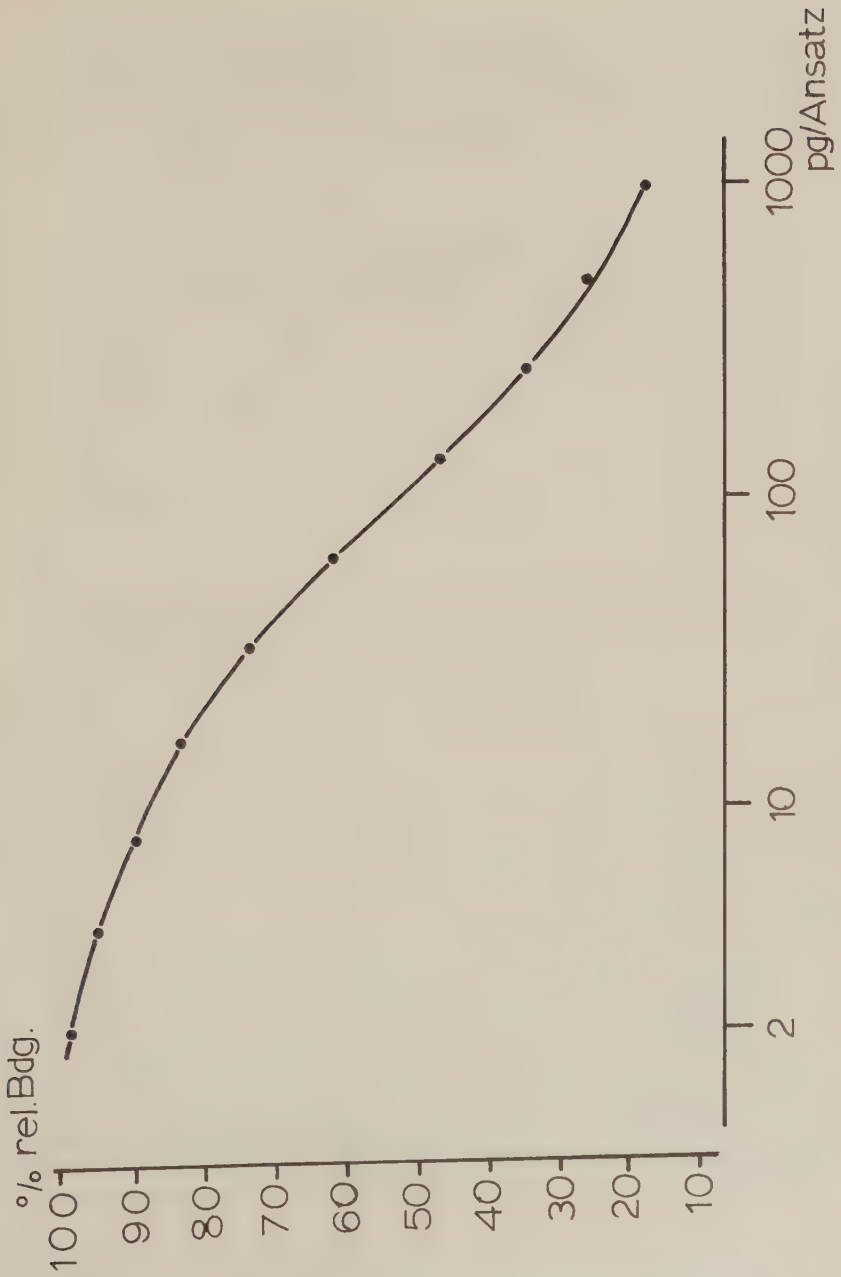


Abb. 18: Standardkurve Ocytocin nach 7 Tagen Vorinkubation

Die Handauswertung der Tests wurde von einer anderen Person vorgenommen oder vor der Berechnung durchgeführt. Als Vergleichsgrößen wurden die Interceptwerte zwischen 20 % und 95 % relativer Bindung herangezogen.

Werte	n	Abweichung Programm "polyn. Regression"	Abweichung Programm Rodbard
20 u. 25 %	11	3,4 $\pm$ 3,1	6,1 $\pm$ 4,4
50 u. 60 %	12	4,2 $\pm$ 4,2	10,1 $\pm$ 13,3
90 u. 95 %	11	7,3 $\pm$ 5,6	25,5 $\pm$ 23,3
alle Werte	93	4,0 $\pm$ 4,7	12,3 $\pm$ 16,0

Tabelle V: Vergleich der verschiedenen Berechnungsmethoden für Radioimmunttests. Die Abweichungen sind in % angegeben. Die Standardabweichungen sind mit angegeben.

Man kann daraus ersehen, daß die Abweichungen des Programmes "polyn. Regression" von der Handauswertung geringer sind als die des Rodbard-Programms. Das gilt über den ganzen Kurvenbereich.

Der Vergleich wurde an LH- und Prolaktintests durchgeführt. Ein Test konnte mit dem von Marschner et al. (1974) entwickelten Programm verglichen werden. Hierbei zeigte es sich, daß die Differenzen zwischen beiden Programmen nur wenige Prozent betrugen. Probleme traten bei meinem Programm dann auf, wenn die Standardkurve des Tests nicht

einwandfrei war, da das Programm alle Punkte gleich bewertet und auch nicht durch einen Zugriff von der Eingabe her geglättet werden kann. In solchen Fällen kann es vorkommen, daß aus den Standardwerten nicht eine Kurve entwickelt wird, welche einen stetigen Verlauf hat, sondern die Kurve auf und ab wandert. In solchen Fällen, die durch das Auszeichnen der Kurve leicht zu erkennen sind, habe ich eine Kurve mit der Hand in der althergebrachten Form gezeichnet und "frisiert" und dann die Werte dieser Kurve eingegeben. Auf diese Weise konnte in sehr vielen Fällen zumindest ein Hinweis über die Testergebnisse gewonnen werden.

In Abb. 19a und 19b ist eine komplette Berechnung eines Tests nach diesem Verfahren zu sehen.

Die Gesamtaktivität wird als erstes nach Eingabe von Datum und Art des Testes über den Lochstreifen eingelesen und der Durchschnitt berechnet.

Die Eingabe der folgenden Werte erfolgt mit der Hand, da ich davon ausging, daß doch immer wieder Werte der Standardkurve herausfallen, was bei einer automatischen Eingabe ein kompliziertes Korrekturprogramm erfordert hätte, zudem wäre mehr Speicherkapazität erforderlich gewesen.

Die Impulswerte der Eingabe werden ausgedruckt, als erstes wird die maximale Bindung berechnet und deren Prozentsatz ausgewiesen. Für die Berechnung der relativen Bindung wird der Wert abgespeichert.

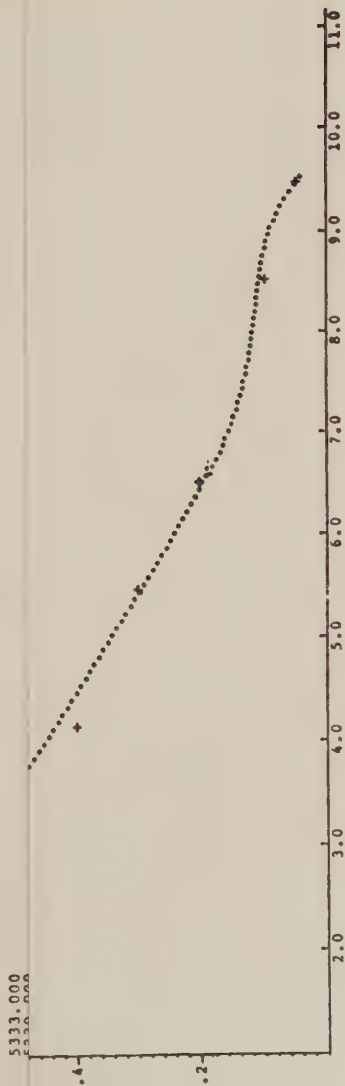
Das Verfahren muß nun für alle Standardwerte durchgeführt werden. Im Anschluß daran berechnet der Computer die Kurve, zeichnet sie und druckt die Koeffizienten aus.

14012
14300
14478
14598
14167
14773
14463
14251
14048
14442
14521
14472

D GesAkt.: 14480.416 M: 13

5529.000
5457.000
Dmax.Bdg: 5493.000 37.986%

Imp/min
ZrelBdg ng



SCALE: X FROM 1.0 10 01 to 1.1 10 02
SCALE: Y FROM .0 10 00 to 2.0 10 00

Abb. 19a: Ausdruck einer Testauswertung durch den Tischrechner (1. Teil)

degree : 3
 No obs : 9

TERM	COEFFICIENTS	STD ERROR	COMPUTED T
0	3.891636	.648223	5.988123
1	-.282203	.088237	-3.198235
2	.009646	.004228	2.281241
3	-.000167	.000090	-1.843908
4	.000001	.000000	1.388796
5	-.000000	.000000	-1.417450

ANOVAR			
SOURCE	DF	SUM SQS	MEAN SQ
REGRESSION	5	1.820975	.364195
RESIDUALS	3	.009024	.003008
TOTAL	8	1.830000	

std. error of estimate : .056846007

2 Mr. lep. 188dg. ng/A ng/ml D Verd. Ident.

Kontrollen Maschine

65	4030	72.366	.132	.489	kein Mittelwert
66	3818	67.306	.160	.800	-----
67	3361	64.827	.186	.980	-----
68	3767	68.578	.166	.832	kein Mittelwert
69	4088	74.421	.133	.665	-----
70	4175	76.005	.136	.634	.649
71	1899	36.991	.496	2.483	-----
72	2138	35.321	.484	2.324	2.404
73	3009	54.778	.293	1.475	-----
74	3036	55.270	.289	1.446	1.462
75	3773	68.887	.165	.828	kein Mittelwert
76	4337	82.596	.110	.551	-----
77	3002	54.651	.296	1.482	-----
78	3101	56.453	.277	1.367	1.435

Abb. 19b: Fortsetzung des Ausdrucks der Testauswertung durch den Tischrechner

Dieser Programmteil schließt mit einem Vergleich der eingegebenen Werte mit den durch die Kurve bzw. das Polynom zu berechnenden Werte. Es läßt sich an dieser Stelle sehr leicht überschlägig die Güte des Tests berechnen.

Ist der Bearbeiter des Tests nicht zufrieden, kann an diesem Punkt der Test erneut gestartet werden.

Scheint der Test in Ordnung, so werden nun die Interceptwerte zwischen 5 und 95 % relativer Bindung errechnet und ausgedruckt. Diese Tabelle in Zusammenhang mit der gezeichneten Kurve hat sich als gutes Auswahlkriterium für den für die Auswertung zu wählenden Bereich erwiesen. Zudem hat sich gezeigt, daß mit Hilfe der Interceptwerte eine Ideal-kurve mehrerer Tests zu erstellen ist, deren Daten notfalls auch zur Testauswertung herangezogen werden können.

Nach diesen Angaben wird durch den Rechner zur Erleichterung noch eine Überschrift ausgedruckt, die gewählten Bereiche werden notiert und in der Folge werden dann über die Lochstreifen die Daten eingelesen, berechnet und ausgedruckt.

Die Proben werden geprüft, ob sie im jeweiligen Ausrechnungsbereich liegen. Liegen sie außerhalb, werden Proben jedoch auf jeden Fall berechnet, allerdings ohne Mittelwerterrechnung, und der Ausdruck gibt einen entsprechenden Hinweis. Gleiches gilt auch für die Errechnung des Mittelwertes. Weichen beide Proben (es ist nur mit Doppelproben zu arbeiten) um mehr als 12 % voneinander ab, dann erfolgt der Ausdruck "kein Mittelwert".

Seit Einführung des Verfahrens am Institut werden nach dieser Methode alle Tests für Proteohormone durchgeführt (also LH, FSH, Prolaktin und TSH). Die Zahl der insgesamt berechneten Tests liegt bei 250. Die Durchführung dieser Arbeiten liegt in den Händen einer nunmehr angelernten technischen Kraft.

3.8 Tastversuche

Um für weitere Untersuchungen im Rahmen des Sonderforschungsbereiches Hinweise zu erhalten, habe ich Plasma aus einer Versuchsreihe untersucht. Die Probengewinnung war problematisch, da es notwendig war, Dauerkatheter über einen Zeitraum von 9 Wochen gängig zu halten, ohne die Tiere gesundheitlich zu schädigen.

Es blieb ein Tier, dessen Gesundheitszustand während des dargestellten Zeitraumes nicht beeinträchtigt war. Es wurden die Werte je eines Tages aus diesen Versuchswochen ausgewählt und bestimmt. Weitere Bestimmungen wurden nicht vorgenommen, da erst noch die Testmethodik verbessert werden sollte.

Das Tier wurde wegen Ausfall eines anderen Tieres erst ab der 3. Woche in den Versuch genommen, es nahm vorher am Versuch allgemein teil.

Die Werte der Wochen 4, 6 und 8 sind in der Abbildung 20 dargestellt.

Die im Warteraum entnommenen Kontrollproben zeigen in jedem Fall Ocytocin im Plasma, nur einmal jedoch über 10 pg. Es fällt auf, daß Werte über 30 pg immer erst nach Ansetzen der Melkbecher (= "3") festzustellen sind. Die Wiederfindung wurde durch zugesetztes markiertes Ocytocin kontrolliert; die Werte sind entsprechend korrigiert.

Die speziellen Manipulationen wie Probenentnahme ("2" = Vormelken einer jeden Zitze von Hand zur Entnahme von Milch für eine Zellzählung) und Nachmelken (= "4") ziehen keinen prägnanten Konzentrationsanstieg nach sich.

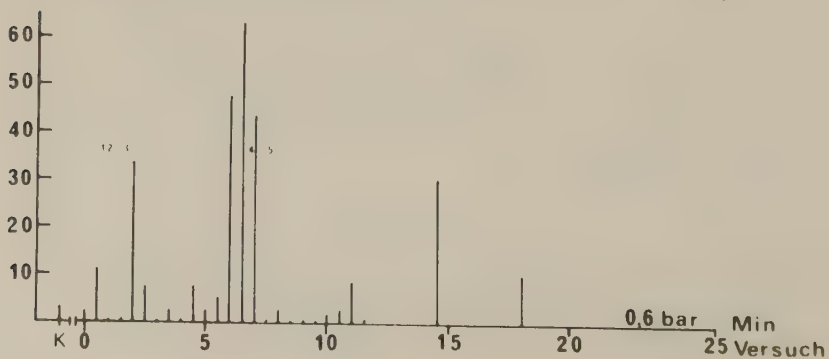
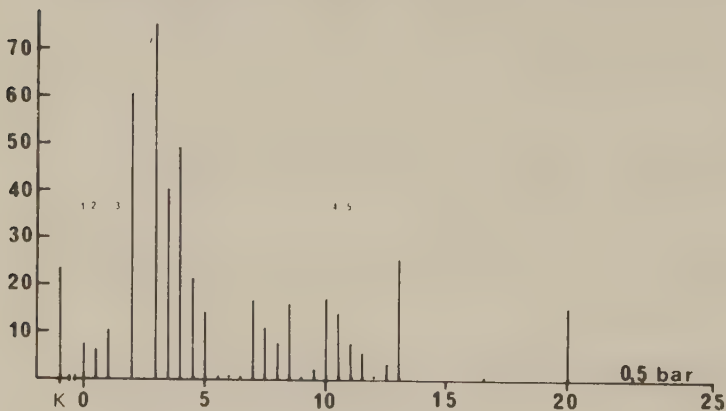
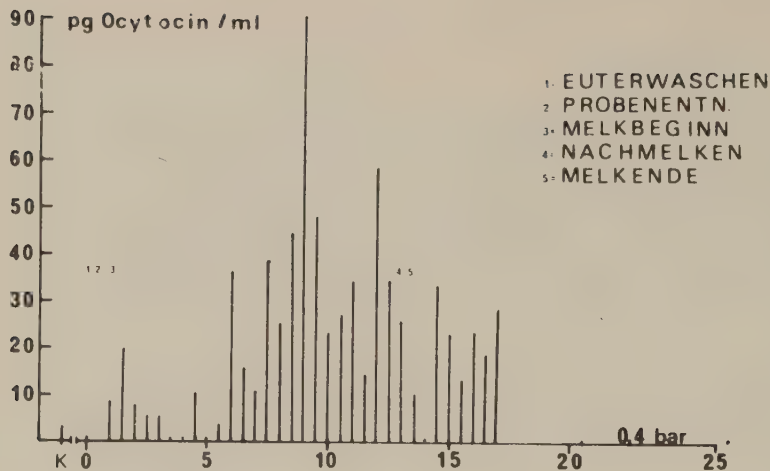


Abb. 20: Konzentrationen von Ocytocin im Plasma der Kuh "Ria" bei einem Melkvakuum von 0,4, 0,5 und 0,6 bar

Die lange Melkzeit bei vermindertem Vakuum ist durch hohe Konzentrationen von Ocytocin im Plasma gekennzeichnet, das höhere übliche Vakuum von 0,5 bar führt zu geringerer Freisetzung von Ocytocin. Das Melken mit einem erhöhten Vakuum von 0,6 bar bewirkt nur kurzzeitige Ocytocinausschüttung.

Bei allen 3 Melkroutinen sind die Ocytocinkonzentrationen nicht kontinuierlich ansteigend und wieder abfallend, vielmehr zeigt sich an allen 3 Untersuchungstagen ein, wenn auch zeitlich verschobener, zweimaliger Ocytocingipfel. Auffallend sind die erhöhten Werte der Kontrollproben beim Vakuum von 0,5 bar und 0,6 bar nach dem Melken.

4. D i s k u s s i o n

Die von Cowie und Tindall (1971) angesprochene Problematik der durch biologische Meßverfahren gewonnenen Daten gilt sicher nicht nur für das Ocytocin; allerdings widersprechen sich bei diesem Peptidhormon die von verschiedenen Autoren gewonnenen Ergebnisse dermaßen, daß die Suche nach einem zuverlässigeren Testsystem naheliegt. Als Methode der Wahl ist unter den heutigen Gegebenheiten der Radioimmunotest anzusehen. Er erreicht die notwendigen Empfindlichkeitsbereiche und erlaubt, einmal etabliert, die Bestimmung von einer so großen Anzahl von Proben, wie dies mit keinem biologischen Testverfahren möglich ist.

Die Bestimmung von biologischen Proben mit dem entwickelten Testsystem weist aus den unten zu besprechenden Gründen noch Mängel auf. Die gewonnenen Werte stimmen allerdings sowohl was den allgemeinen Verlauf während des Melkens angeht als auch in der Höhe auffallend gut mit den von Forsling et al. (1974) beschriebenen Werten überein. So liegen die Maximalkonzentrationen bei ca. 50 μ U/ml Plasma, eine zweimalige deutliche Freisetzung von Ocytocin während des Melkens ist zu sehen. Auch ein anderer Befund scheint sich zu bestätigen, nämlich daß die Manipulationen am Euter vor dem Ansetzen der Melkmaschine nicht so ausschlaggebend sind wie immer angenommen wurde. Etwas unerklärlich erscheint das Ansteigen des Ocytocin 10 - 20 Minuten nach Melkende. Da nach den bekannten Messungen ein solcher Effekt bisher nicht beschrieben wurde, könnte es sich um einen Mangel des Testsystems handeln, allerdings trat auch bei der von Forsling et al. gemachten Untersuchung ein solcher später Gipfelwert auf. Die Schwächen der durchgeführten Messungen liegen darin, daß sie noch mit methodischen Mängeln behaftet waren; so sind, trotz des positiven Anscheins, die Ergebnisse äußerst vorsichtig zu beurteilen, insbesondere was die Absolutwerte angeht. Aus diesem Grunde wurden auch noch keine weiteren Proben untersucht.

Das von Greenwood et al. (1963) eingeführte Markierungsverfahren mit Chloramin T hat sich mittlerweile für die Markierung zahlreicher Proteohormone mit radioaktivem Jod durchgesetzt. Der Nachteil der Methode liegt darin, daß sie verhältnismäßig rigoros ist und unter Umständen das zu markierende Hormon durch das Chloramin T in Mitleidenschaft gezogen wird.

Mit dem Versuch, Radiorezeptortests für Proteohormone zu entwickeln, standen einige Arbeitsgruppen (z.B. Frantz und Turkington 1972) vor dem Problem, daß das radioaktiv markierte Hormon nicht an den Rezeptor gebunden wurde; es hatte seine biologischen Eigenschaften im Markierungsprozeß verloren.

Eine ähnliche Schädigung vermutete ich bei dem von mir markierten Ocytocin, als die Messung von Plasmaproben Schwierigkeiten mit sich brachte.

Daher setzte ich für Ocytocin die für FSH entwickelte Methode der enzymatischen Markierung (Schams, Schallenger 1976) ein. Es bereitete keinerlei Probleme, die Methode zu adaptieren, die eingesetzte Aktivität wurde zu fast 90 % ans Ocytocin gebunden.

Gleichzeitig hatte mich bei diesem Versuch interessiert, ob die Laktoperoxydase ebenfalls in diesem Prozeß mitmarkiert werden kann. Da das Molekulargewicht der Peroxydase dem des nach dieser Methode markierten FSH sehr ähnlich ist, konnte eine Reinigung über Sephadex G 50 keine Aufklärung bringen. Die Verwendung des wesentlich kleineren Moleküls Ocytocin dagegen unterstreicht die Vermutung der Selbstmarkierung der Laktoperoxydase, da in dem Eluat, in welchem normalerweise das großmolekulare Hormon eluiert wird, ein kleiner, aber deutlicher Peak auftrat. Es könnte demnach bei manchen Versuchen die Markierung der Laktoperoxydase eine Hormonmarkierung vortäuschen.

Die Verwendung des auf diese Weise markierten Ocytocins erbrachte nicht die erhofften Vorteile bei den Untersuchungen.

Es wurde auch noch die von Rosa (1964) eingeführte elektrische Markierung von Eiweißen untersucht, bei der keine Fremdsubstanz mit dem Peptid in Kontakt kommt.

Aus dem elektrophoretischen Bild konnte man erkennen, daß eine Markierung stattgefunden haben mußte, allerdings nicht, wie das von Kluge et al. (1969) für Insulin angegeben wurde, nach etwa 90 Minuten, sondern die Markierung scheint bereits nach 15 Minuten abgeschlossen zu sein. Vielleicht ist dies auch der Grund, weshalb die Markierung im Test zu keinem Ergebnis führte, da hierzu das Reaktionsgemisch nach 90 Minuten Versuch genommen wurde.

Die Versuchsreihen zeigten, daß zwei Markierungsmethoden zu einer guten Ocytocinmarkierung führten; die Methode der elektrischen Markierung müßte noch eingehender untersucht werden, dürfte aber ebenfalls zum Erfolg führen.

Die Frage nach der günstigsten Inkubationszeit konnte in einem Versuch ohne Schwierigkeiten beantwortet werden. Die Vorinkubation von 5 Tagen erscheint der beste Kompromiß zwischen optimaler Inkubationszeit und organisatorischen Erfordernissen. So können Tests an drei Tagen der Woche (Mittwoch - Freitag) angesetzt werden und in der darauffolgenden Woche dann an den entsprechenden Tagen weiter bearbeitet werden. Das System ist also in einen Routinebetrieb problemlos einzubauen.

Die Extraktion aus biologischen Flüssigkeiten war mit allen Methoden möglich. Die beste Ausbeute wurde mit Spherosil, Methanol und Aceton erreicht; allerdings ist Spherosil für das Rinderplasma nur beschränkt einsetzbar, da das zeitweilige Ausgelieren des Plasmas den Verlust der Probe zur Folge hat. Will man dieses Risiko eines totalen Verlustes vermeiden, muß man sich entweder mit einer geringeren Ausbeute zufrieden geben oder eine der beiden anderen Methoden anwenden.

Worin die Ursache liegt, daß Messungen der Extrakte praktisch kaum möglich waren, bleibt Spekulation. Lipide, welche eine Rolle spielen könnten, müßten den Extrakt mit dem Äther verlassen haben. Es könnte sich auch noch um Kreuzreaktionen mit nahe verwandten Molekülen handeln. Dies erscheint mir jedoch weniger wahrscheinlich, da speziell das Antiserum Olaf 3 nicht einmal mit Vasopressinen kreuzreagierte. Nicht von der Hand zu weisen wären allerdings evtl. auftretende Kreuzreaktionen mit den Neurophysinen. Wenn sie auch als Ganzes eigentlich nicht mit extrahiert werden sollten, so könnten doch Bruchstücke den Test stören. Leider standen sie für eine Untersuchung nicht zur Verfügung. Es bleibt auch noch offen, ob sich das zur Kontrolle der Ausbeute verwendete markierte Ocytocin anders verhält, als das kalte Hormon bzw. ob vielleicht das Hormon durch den Extraktionsvorgang so weit geschädigt wird, daß zwar noch Radioaktivität an einzelnen Bruchstücken meßbar mit extrahiert wurde, die immunologischen Eigenschaften aber verloren sind. Die von mir gemachten Untersuchungen im biologischen Testsystem widersprechen jedoch dieser Hypothese: der mit Spherosil gewonnene Extrakt war immer im Biotest einzusetzen und es ist unwahrscheinlich, wenn auch nicht unmöglich, daß die biologische Wirksamkeit bei Verlust der immunologischen erhalten blieb.

Antisera konnten von 13 Kaninchen nur bei zwei Tieren gewonnen werden, mit denen sich Standardkurven in einem Testsystem erstellen ließen.

Auch andere Arbeitsgruppen hatten nur mit verhältnismäßig großen Tierzahlen Erfolg (Forsling, pers. Mitt.). Es fällt weiterhin auf, daß allen Berichten über Ocytocintests ein Mangel an Kontinuität eigen ist, das heißt, 'daß der Veröffentlichung der ersten gewonnenen Untersuchungsergebnisse meist kein zweiter Bericht folgt, das Testsystem auch nicht anderen Untersuchern zur Verfügung gestellt wurde. Dies ist eigenartigerweise bei Testsystemen, welche sich mit der Untersuchung von Vasopressin beschäftigen, nicht der Fall.

Die einzige Ausnahme bildet hier meines Wissens die Arbeitsgruppe Chard, die mit dem einmal eingeführten Test über mehrere Jahre Proben bestimmte. Diese Gruppe verwendet für diese Untersuchungen ein einziges Antiserum, auch dieser Gruppe gelang es bis heute nicht, andere zu gewinnen (Forsling, pers. Mitt.).

In meinen Untersuchungen ging ich ursprünglich davon aus, daß es möglich sein müsse, mit einem Antiserum, mit welchem sich ausgezeichnete Standardkurven erstellen lassen, auch auf irgendeine Art das Hormon aus Extrakten oder direkt im Plasma reproduzierbar zu messen. Da keine der in der Literatur und keine der von mir zusätzlich entwickelten Methoden einen befriedigenden Erfolg zeigten, glaube ich, daß es notwendig ist, nicht diese Methoden weiterzuentwickeln, sondern man eher durch die Gewinnung neuer Antisera - ein allerdings langwieriger und vom Zufall abhängiger Weg - Erfolg haben kann.

Die zuerst von Rodbard et al. (1969) entwickelten Methoden der rechnerischen Auswertung von Radioimmunotests war durch die immense Ausweitung dieser Methoden erforderlich geworden. Man wollte Zeit sparen und gleichzeitig die Fehleranfälligkeit herabsetzen. Als der Wunsch aufkam, standen den meisten Laboratorien nur einfache Rechenmaschinen zur Verfügung. Die Grundidee war nun, die Standardkurven, die zur Auswertung herangezogen werden, so umzuformen, daß sie als Gerade darzustellen waren. Diese Gerade ist dann leicht zu berechnen und auch die Unbekannten sind danach leicht aus der Geraden durch eine simple Gleichung bestimmbar.

Das System hat den Vorteil, daß es nach Einübung auch von mathematisch nicht vorgebildetem Personal benutzt werden kann. Heute stehen häufig schon Großrechenanlagen zur Verfügung. Rodbard et al. (1969) schlugen das Logitsystem zur Linearisierung vor. Einen etwas anderen Weg wählten Brown et al. (1970). Sie setzten einen Computer zur Auswertung ein, konnten daher eine etwas kompliziertere Gleichung heranziehen: sie logarithmierten die Werte der X-Achse ($\hat{=}$ kaltem Hormon) und berechneten dann eine Gleichung zweiten Grades.

Marschner et al. (1974) entwickelten ebenfalls an einer Großrechenanlage die Auswertung mittels Gleichungen dritten Grades, die zwischen die einzelnen Standardpunkte gelegt, verknüpft und an den Übergangsstellen geglättet werden.

Alle diese Verfahren entstanden wohl eher aus der Empirie als von einer mathematischen Grundlage her. Ausgangspunkt war immer das Bild der Standardkurve und dann der Versuch, ein mathematisches Muster zu finden, welches paßt.

Auch mein Verfahren ist ein solches mathematisches Muster für die Anpassung einer mathematischen Formel an ein vorgegebenes Modell.

Anders als die oben erwähnten Autoren habe ich nicht versucht, durch Logarithmieren das Kurvenbild so zu verändern, daß es in ein allgemein lösbares Gleichungssystem paßt, sondern ich habe das Problem, eine Gleichung 5. Grades lösen zu müssen, durch Vertauschen der entsprechenden Achsen umgangen:

bei bekanntem "x" ist das "y" für Polynome jeden Grades zu errechnen ($Y = a_0 + a_1 x^1 + a_2 x^2 \dots a_n x^n$).

Daß der eingeschlagene Weg unter den gegebenen Umständen der richtige war, zeigt sich daran, daß die Methode seit etwa 2 Jahren im Labor für alle Proteohormone angewandt wird und sich bewährt hat.

Die Berechnung der Tests stellt seitdem keinen limitierenden Faktor mehr dar. Die Methode ist inzwischen Routine-methode geworden.

5. Zusammenfassung

In der Arbeit wurde versucht, Methoden für die Bestimmung von Ocytocin im Rinderplasma mittels Radioimmuno- test zu entwickeln.

1. Drei Markierungsverfahren wurden durchgeführt und überprüft: Die Markierung mit Chloramin T und Lakto- peroxydase waren in einem radioimmunologischen Test- system einsetzbar. Ein elektrisches Markierungsver- fahren wird beschrieben.
2. Die Extraktion von zugegebenem markiertem Ocytocin aus Plasma konnte mit verschiedenen Methoden erfolg- reich durchgeführt werden. Die Messung von endogenem oder zugesetztem Hormon aus solchen Extrakten führte nicht zu einheitlichen Ergebnissen.
3. Die Produktion von Antisera wird beschrieben. Von 13 Tieren hatten 2, welche direkt in die Lymphkno- ten injiziert wurden, einen brauchbaren Titer. Die Antisera waren zur Erstellung von Standardkurven ge- eignet, Messungen im Rinderplasma wurden durchgeführt; sie stimmen mit den aus der Literatur bekannten Er- gebnissen zwar gut überein, sind aber wegen der schlech- ten Reproduzierbarkeit nur mit Vorbehalt zu beurteilen. Es wird vorgeschlagen, zur Verbesserung des Testsystems die Produktion neuer Antisera zu versuchen.
4. Die rechnerische Auswertung über einen Kleincomputer wurde erarbeitet. Die Methode bedient sich der Ver- tauschung von X- und Y-Achse des Koordinatensystems. Über ein Polynom 5. Grades werden die Standardkurven berechnet, gezeichnet und die unbekannten Proben bestimmt.

S u m m a r y

It was attempted to develop a radioimmunological test system for oxytocin in bovine plasma.

1. Three methods of labelling have been evaluated. The methods using chloramin T and lactoperoxydase have been proved to be suitable. Furthermore a system using electricity for the labelling procedure is described.
2. The extraction procedure to recover labelled oxytocin from bovine plasma could be carried out by several methods. The evaluation of endogenous or added hormone didn't lead to reproduceable results.
3. The production of antisera is described. The antisera of two rabbits (injected directly into the lymphnodes) were used for the preparation of standard curves. Measurements of oxytocin in bovine plasma were attempted. Although these results agree with some data available from the literature they should be considered with reserve due to the poor reproducibility. Therefore it is suggested to approach again the production of new antisera.
4. The use of a calculator for the estimation of unknowns is described. Improvement of the method had been achieved by changing the ordinate value to the abscissa and vice versa. The standard curves are calculated by a fifth degree polynome.

6. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- Acher, R. 1962
The comparative chemistry of neurohypophysial hormones
Symp. zool. Soc. London 9 83 - 91
- Acher, R., Fromageot, C. 1957
The relationship of oxytocin and vasopressin to active proteins of posterior pituitary origin
In: The Neurohypophysis Ed. H. Heller
Butterworth, London 39 - 50
- Acher, R., Chauvet, J., Oliverly, M. 1956
Sur l'existence eventuelle d'une hormone unique neurohypophysaire
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 22 428 - 433
- Acher, R., Chauvet, J., Chauvet, M.T., Crepy, D. 1965
Phylogénie des peptides neurohypophysaires
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 107 393 - 396
- Adamson, K., Engel, S.L., van Dyke, H.B. 1958
Stability of neurohypophysial hormones
Endocrinology 63 679 - 687
- Ågmo, J.A. 1975
Neurohypophysial hormones and the emission of semen in rabbits
J. Reprod. Fert. 45 243 - 248
- Armstrong, D.T., Hansel, W. 1959
Alteration of the bovine cycle with oxytocin
J. Dairy Sci. 42 533 - 542

- Aulsebrook, L.H., Holland, R. 1969a
Central regulation of oxytocin release with and
without vasopressin release
Amer. J. Physiol. 216 818 - 829
- Aulsebrook, L.H., Holland, R.C. 1969b
Central inhibition of oxytocin release
Amer. J. Physiol. 216 830 - 842
- Bangham, D.R., Musset, M.V. 1958
Third international standard for posterior pituitary
Bull. Wld Hlth Org. 19 325 - 340
- Bargmann, W. 1968
Neurohypophysis. Structure and function
In: Handbook of experimental pharmacology XXIII
Neurohypophysial hormones and similar polypeptides
Ed. E. Berde
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1 - 39
- Bargmann, W., Scharrer, E. 1951
The site of the origin of the hormones of the
posterior pituitary
Amer. Scientist 39 255 - 259
- Bargmann, W., Lindner, E., Andres, K.H. 1967
Über Synapsen an endokrinen Epithelzellen und die
Definition sekretorischer Neurone. Untersuchungen
am Zwischenlappen der Katzenhypophyse
Z. Zellforsch. 77 282 - 298
- Barowitz, I., Ewy, Z. 1973
Oxytocic activity measurements in blood plasma, with
some observations on oxytocin disappearance rates in
lactating cows
Bull. Acad. Pol. Sci. biol. 9 615 - 619

- Bashore, R.A., Jafek, B., Coblenz, Ch. 1970
Oxytocin antibody
Obstet. and Gynec. 36 391 - 397
- Beauvillain, A. 1943
Titration des préparations posthypophysaires par
leur seuil d'action sur l'utérus isolé de rat
adulte
C.R. Soc. Biol. (Paris) 137 284 - 285
- Bell, W.B. 1909
The pituitary body and the therapeutic value of
the infundibular extract in shock, uterine atony
and intestinal paresis
Brit. Med. J. 1 1609 - 1613
- Bell, W.B., Hick, P. 1909
Observations on the physiology of the female
genital organs
Brit. Med. J. 1 777 - 783
- Bindler, E., Labella, F., Sanwal, M. 1967
Isolated nerve endings from posterior pituitary
J. Cell Biol. 34 185 - 205
- Bisset, G.W., Clark, B.J., Haldar, J., Harris, M.C.,
Lewis, G.P., Rocha e Silva jr. M. 1967
The assay of milk-ejecting activity in the
lactating rat
Brit. J. Pharmacol. 31 537 - 549
- Boissonnas, R.A., Guttmann, St. 1968
Chemistry of the neurohypophysial hormones
In: Handbook of experimental pharmacology XXIII
Neurohypophysial hormones and similar polypeptides
Ed. E. Berge
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 40 - 66

- Boyd, N.R.H., Jackson, D.B., Hollingsworth Stella,
Forsling, Mary, L., Chard, T. 1972
The development of a radioimmunoassay for oxytocin:
the extraction of oxytocin from urine and determina-
tion of the exogenous and endogenous oxytocin in
human urine
J. Endocr. 52 59 - 67
- Brandsma, S. 1969
Stimulation by the milking machine
In: Proceedings of the symp. on machine milking 1968
Ed. Hall H.A.
The National Inst. for Research in Dairying
Shinfield Reading England 119 - 129
- Brewster, A.J.R., Hruby, V.J., Glasel, J.A.,
Tonelli, A.E. 1973
Proposed confirmations of oxytocin and selected
analogs in dimethyl sulfoxide as deduced from
proton magnetic resonance studies
Biochemistry 12 5294 - 5304
- Brzezinska-Slebodzinska, E. 1974
Inactivation of oxytocin and synthetic oxytocin
analogues by hen tissues
J. Endocr. 63 361 - 368
- Brown, G.M., Boshaus, R.Z., Schalch, D.S. 1970
Computer calculation of radioimmunoassays
Comp. Biomed. Res. 3 212 - 217
- Burn, J.H., Dale, H.H. 1922
Reports on biological standards. I: On the physiolo-
gical standardisation of the extracts of the posterior
pituitary body
Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun. Lond. 69
5 - 52

- Burton, A.M., Illingworth, D.V., Challis, J.R.G.,
McNeilly, A.S. 1974
Placental transfer of oxytocin in the guinea-pig
and its release during parturition
J. Endocr. 60 499 - 506
- Capra, J.D., Keheo, P.M., Kotelchuk, D. 1972
Evolution of neurophysin-proteins: the partial
sequence of bovine-neurophysin I
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 69 431 - 434
- Chard, T. 1972
The posterior pituitary in human and animal
parturition
J. Reprod. Fert. Suppl. 16 121 - 138
- Chard, T., Forsling Mary L., Kitau Muriel J. 1969
Development of a radioimmunoassay for oxytocin
J. Endocr. 43
- Chard, T., Kitau, M.J., Landon, J. 1970a
The development of a radioimmunoassay for oxytocin:
radioiodination, antibody production and separation
techniques
J. Endocr. 46 269 - 278
- Chard, T., Hudson, C.N., Edwards, C.R.W.,
Boyd, N.R.H. 1971
Release of oxytocin and vasopressin by the human
foetus during labour
Nature 234 352 - 354

- Chard, T., Forsling, Mary L., James, M.A.R.,
Kitau, M.J., Landon, J. 1970b
The development of a radioimmunoassay for oxytocin:
sensitivity of the assay in aqueous buffer solution
specificity and the dissociation of immunological
and biological activity
J. Endocr. 46 533 - 542
- Chard, T., Boyd, N.R.H., Forsling Mary L., McNeilly, A.S.,
Landon, J. 1970c
The development of a radioimmunoassay for oxytocin:
the extraction of oxytocin from plasma and its
measurement during parturition in human and goat
blood.
J. Endocr. 48 223 - 234
- Cleverly Jacqueline D., Folley, J. 1970
The blood levels of oxytocin during machine milking
in cows, with some observation on its half life in
the circulation
J. Endocr. 46 347 - 361
- Cobo, E. 1973
Effect of different doses of ethanol on the milk
ejecting reflex in lactating woman
Am. J. Obstet. Gynec. 115 817 - 821
- Coch, J.A., Fielitz, C.A., Brovetto, J., Cabot, H.M.,
Coda, H., Fraga, A. 1968
Estimation of an oxytocin-like substance in highly
purified extracts from the blood of puerperal women
during suckling
J. Endocr. 40 137 - 144

- Coon, J.M. 1939
A new method for the assay of posterior pituitary
extracts
Arch. int. Pharmacodyn. 62 79 - 99
- Cowie, S., Tindal, J.S. 1971
The physiology of lactation
Edward Arnold (Publishers) Ltd., London
- Cross, B.A. 1966
Neural control of oxytocin secretion
In: Neuroendocrinology
Eds Martini, L. and Ganong, W.
Vol. 1 Ch 7, 217 - 259
Academic Press New York and London
- Dale, H.H. 1906
On some physiological actions of ergot
J. Physiol. (Lond.) 34 163 - 206
- Dale, H.H., Laidlaw, P.P. 1912
A method of standardising pituitary (infundibular)
extract
J. Pharmacol. exp. Ther. 4 75 - 95
- Debackere, M., Peeters, G., Tuytens, N. 1961
Reflex release of an oxytocic hormone by stimu-
lation of genital organs in male and female sheep
studied by a crosscirculation technique
J. Endocr. 22 321 - 334
- Dicker, S.E. 1953
Method for the assay of very small amounts of
antidiuretic activity with a note on the antidiu-
retic titre of rat's blood.
J. Physiol. (Lond.) 122 149 - 157

- Döcke, F. 1975
Das Hypothalamus-Hypophysen-System
In: Veterinärmedizinische Endokrinologie
Hrsg. Döcke, F.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 119 - 168
- Donaldson, L.E., Lloyd, E., Hansel, W.,
Van Vleck, L.D. 1965
Luteotropic properties of luteinizing hormone and
nature of oxytocin induced luteal inhibition in
cattle
J. Dairy Sci. 48 331 - 337
- van Dongen, C.G., Hays, R.L. 1966
A sensitive in vitro assay for oxytocin
Endocrinology 78 1 - 6
- Douglas, W.W., Poisner, A.M. 1964a
Stimulus-secretion coupling in a neurosecretory
organ: the role of calcium in the release of vaso-
pressin from the neurohypophysis
J. Physiol. (Lond.) 172 1 - 18
- Douglas, W.W., Poisner, A.M. 1964b
Calcium movement in the neurohypophysis of the rat
and its relation to the release of vasopressin
J. Physiol. (Lond.) 172 19 - 30
- Dreifuss, J.J., Akert, K., Sandri, C., Moor, H. 1973
The fine structure of freeze-fracturated neuro-
secretory nerve endings in the neurohypophysis
Brain Research 62 367 - 372

- van Dyke, H.B., Chow, B.F., Greep, R.O.,
Rothen, A. 1942
The isolation of a protein from the pars neuralis
of the ox pituitary with constant oxytotic, pressor
and diuresis inhibiting activities
J. Pharmacol. exp. Ther. 74 190 - 209
- Ely, F., Petersen, W.E. 1941
Factors involved in the ejection of milk
J. Dairy Sci. 24 211 - 223
- Fabert, G., Wolf, G., Sterba, F. 1973
Molekulares Verhältnis von Oxytocin und Neuro-
physin in Neurohypophyse und Hypothalamus der
Ratte - Radioimmunoassey
Endokrinologie 62 291 - 296
- Fabian, M., Forsling, M.L., Jones, J.J., Lee, J. 1969a
The release, clearance and plasma protein binding
of oxytocin in the anaesthetized rat
J. Endocr. 43 175 - 189
- Fabian, M., Forsling, M.L., Jones, J.J., Lee, J. 1969b
Comparison of two methods for the bioassay of
oxytocin
Endocrinology 85 600 - 603
- Fekete, K. 1930
Beiträge zur Physiologie der Gravidität
Endokrinologie 7 364 - 369
- Ferguson, J.K.W. 1941
A study of the motility of the intact uterus at
term
Surg. Gynec. Obstet. 73 359 - 366

- Fitzpatrick, R.J., Walmsley, Ch.F. 1965
The release of oxytocin during parturition
In: Advances in oxytocin research
Ed. J.H.M. Pinkerton;
Oxford, Pergamon Press S. 51 - 73
- Flatters, M. 1954
Über die Vorzüge der Verwendung von 'Ratten-Uteri
in Proöstrus zur Auswertung von Oxytocin
Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 221 171 - 176
- Fletcher, J.C. 1973
Effects of lactation, suckling and oxytocin on post-
partum ovulation and oestrus in ewes
J. Reprod. Fert. 33 293 - 298
- Flint, A.P.F., Forsling, M.L., Mitchel, M.D.,
Turnbull, A.C. 1975
Temporal relationship between changes in oxytocin
and prostaglandin F levels in response to vaginal
distension in the pregnant and puerperal ewe
J. Reprod. Fert. 43 551 - 554
- Follett, B.K., Bentley, P.J. 1964
The bioassay of oxytocin: increased sensitivity of
the rat uterus in response to serial injections
of stilboestrol
J. Endocr. 29 277 - 282
- Folley, S.J., Knaggs, G.S. 1965
Levels of oxytocin in the jugular vein blood of
goats during parturition
J. Endocr. 33 301 - 315

- Folley, J.S., Knaggs, G.S. 1966
Milk-ejection activity (oxytocin) in the external
jugular vein blood of the cow, goat and sow, in
relation to the stimulus of milking or suckling
J. Endocr. 34 197 - 214
- Forsling, M.L., Reinhardt, V., Himmler, V. 1974
Neurohypophysial hormones and prolactin release
J. Endocr. 63 579 - 780
- Frantz, W.L., Turkington, R.W. 1972
Formation of biologically active ^{125}J -prolactin
by enzymatic radioiodination
Endocrinology 91 1545 - 1549
- Fuchs, Anna-Riita 1969
Ethanol and the inhibition of oxytocin release
in lactating rat
Acta Endocr. (Kbh.) 62 546 - 554
- Gaines, W.L. 1915
A contribution to the physiology of lactation
Amer. J. Physiol. 38 285 - 312
- Gilliland, P.E., Prout, T.E. 1965b
II. Production and detection of antibodies to
oxytocin
Metabolism 14 918 - 923
- Ginsburgh, M., Smith, M.W. 1959
The fate of oxytocin in male and female rats
Brit. J. Pharmacol. 14 327 - 333

- González - Panizza, V.H., Sica-Blanco, Y.,
Méndez-Bauer, C.J. 1961
The fate of injected oxytocin in the pregnant
woman near term
In: Oxytocin. Eds R. Caldeyro-Barcia and H. Heller
London, Pergamon Press 347 - 357
- Grau, H., Walter, P. 1967
Grundriß der Histologie und vergleichenden mikrosko-
pischen Anatomie der Haussäugetiere, 1. Auflage
Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg
- Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S. 1963
The preparation of ^{131}J -labelled human growth
hormone of high specific radioactivity
Biochem. J. 89 114 - 123
- Gusdon, J.P. 1967
An antibody to oxytocin
Amer. J. Obstet. Gynec. 98 526 - 534
- Harms, P.G., Niswender, G., Malven, P.V. 1969
Progesterone and LH secretion during luteal in-
hibition by exog. oxytocin
Biol. Reprod. 1 228 - 233
- Hawker, N.W., Walmsley, C.F., Roberts, V.S.,
Blackshaw, J.K., Downes, J.C. 1961
Oxytocin activity of blood in parturient and
lactating women
J. Clin. Endocr. Metab. 31 985 - 995
- Hayward, J.N., Pavasuthipaisit, K., Perez-Lopez, F.R.,
Sofroniew, M.S. 1976
Radioimmunoassay of arginine vasopressin in
rhesus monkey plasma
Endocrinology 98 875 - 981

- Hladik, O. 1966
Markierung von Humanserumalbumin mit ^{131}J durch
elektrochemische Oxydation von Jodid zum Jod
Isotopenpraxis 2 296 - 297
- Hollenberg, M.D., Hope, D.B. 1968
The isolation of the native hormone-binding proteins
from bovine pituitary posterior lobes:
crystallization of neurophysin I + II as complexes
with 8-arginine-vasopressin
Biochem. J. 106 557 - 564
- Holton, P. 1948
A modification of the method of Dale and Laidlaw
for standardisation of posterior pituitary extract
Brit. J. Pharmacol. 3 328 - 334
- Kamm, O., Aldrich, T.B., Grote, J.W., Rowe, L.W.,
Bugbee, E.P. 1928
The active principles of the posterior lobe of
the pituitary gland
J. Amer. Chem. Soc. 50 573 - 601
- Karlson, P. 1967
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
6. Auflage
Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Kato, H., Torigoe, T. 1974
Radioimmunoassay for oxytocin
Endocr. Jap. 21 81 - 87
- Kluge, H.O., Köhler, H., Rotzsch, W., Lohmann, D.,
Schäfer, A., Bemm, H. 1969
Anodische Oxydation von Radiojodid zur Insulin-
markierung
Z. inn. Med. 24 57 - 59

- Knaggs, G.S., McNeilly, A.S., Tindal, S.J. 1972
The afferent pathway of the milk ejection reflex
in the mid-brain of the goat
J. Endocr. 52 333 - 341
- Knoll, W., Kaller, H. 1952
Die Auswertung von Hypophysenhinterlappen-Extrakten
am isolierten Meerschweinchen-Uterus mit Hilfe der
mittleren Kontraktionshöhe in der Endeinstellung
Arch. exp. Path. Pharmacol. 215 133 - 147
- Kurkbart, H., Coli, A., Vaucherie, L., Rosa, U. 1971
Chemical and biological effects associated with
the iodination of angiotensin II
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 230 160 - 169
- Lederis, K. 1961
Vasopressin and oxytocin in mammalian hypothalamus
Gen. comp. Endocr. 1 80 - 89
- Lawson, P.M., Graf, G.C. 1968
Plasma oxytocic activity and intramammary pressure
in lactating cow
J. Dairy Sci. 51 1676 - 1679
- Legros, J.J., Louis, F. 1973/74
Identification of a vasopressin neurophysin and of
an oxytocin-neurophysin in man
Neuroendocrinology 13 371 - 375
- Lincoln, D.W., Hill Alison, Wakerley, J.B. 1973
The milk-ejection reflex of the rat: an intermittend
function not abolished by surgical levels of
anaesthesia
J. Endocr. 57 459 - 476

- Linzell, J.L. 1955
Some observations on the contractile tissue of
the mammary glands
J. Physiol. (Lond.) 130 257 - 267
- Linzell, J.L. 1959
The innervation of the mammary glands in the sheep
and goat with some observations on the lumbosacral
autonomic nerves
Quart.J.exp. Physiol. 44 160 - 177
- Marks, N., Abrash, L., Roderich, W. 1973
Degradation of neurohypophysial hormones by brain
extracts and purified brain enzymes
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 142 455 - 460
- Marschner, J., Dobry, H., Erhardt, F., Landesdorfer, T.,
Popp, B., Ringel, C., Scriba, P.C. 1974
Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels
Spline-Funktionen
Ärztl. Lab. 20 184 - 191
- Master, W.H., Johnson, V.E. 1970
Die sexuelle Reaktion
wiss. Bearbeitung der dtsh. Ausgabe von
V. Sigusch
Rowohlt Taschenbuch Verlag GmbH, Reinbeck
bei Hamburg
- McCracken, J. 1971
Prostaglandins and corpus luteum regression
Ann. N.Y. Acad. Sci. 180 456 - 469

- McNeilly, A.S. 1972
The blood levels of oxytocin during suckling and
handmilking in the goat with some observations on
the pattern of hormone release
J. Endocr. 52 177 - 188
- McNeilly, A.S., Forsling, M.L., Chard, T. 1971
Diskussionsbeitrag
In: Radioimmunoassay methods
Eds Kirkham H.E., Hunter, W.M.
Churchill Livingstone, Edinburgh 558 - 560
- McNeilly, A.S., Legros, J.J., Forsling, M.L. 1972
Release of oxytocin, vasopressin and neurophysin
in the goat
J. Endocr. 52 209 - 210
- Méndez-Bauer, C., Cabot, H.M., Caldeyro-Barcia, R. 1960
A new test for the biological assay of oxytocin
Science 132 299 - 300
- Momongan, V.G., Schmidt, G.H. 1970
Oxytocin levels in the plasma of Holstein-Frisian
cows during milking with and without a premilking
stimulus
J. Dairy Sci. 53 747 - 756
- Moore, R.D. Zarrow, M.X. 1965
Contraction of the rabbit mammary strip in vitro
in response to oxytocin
Acta Endocr. (Kbh) 48 186 - 198
- The Nomenclatur of peptide hormones 1975
Endocrinology 97 1606 - 1607

- Odell, W., Skowsky, R., Abraham, G., Hescocx, M.,
Fisher, D., Grover, P.K. 1972
Production of antisera for polypeptide and steroid
radioimmunoassay
Biol. Reprod. 6 427 - 442
- Ogle, C.W., Lockett, M.F. 1966
The release of neurohypophysial hormone by sound
J. Endocr. 36 281 - 290
- Oliver, G., Schäfer, E.A. 1895
On the physiological action of extracts of
pituitary body and certain other glandular
organs
J. Physiol. (Lond.) 18 277 - 279
- Ollivier-Bousquet Michèle 1976
Effet de l'oxytocine in vitro sur le transit intra-
cellulaire et la sécrétion des protéines du lait
C.R. Acad. Sc. Paris 282 1433 - 1436
- Ott, I., Scott, J.C. 1910
The action of infundibulin, upon the mammary
secretion
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 8 48 - 49
- Parau, D. 1975
Studien zur Geschichte des Milchentzuges
Volkswirtschaftlicher Verlag, Kempten
- Parkash, V., Anderson, R.R. 1972
Pituitary and blood plasma oxytocic activity and
oxytocin disappearance rates in cattle
J. Dairy Sci. 55 75 - 79

- Peeters, C., de Buysscher, E., Vandervelde, M. 1973
Milk ejection in primiparous heifers in the
presence of their calves
Zbl. Vet. Med. A 20 531 - 536
- Pickering, B.T. 1968
A neurophysin from cod pituitary glands:
isolation and properties
J. Endocr. 42 143 - 152
- Pohlmeyer, K. 1972
Untersuchungen über den Einfluß von Oxytocin auf
das Erstbesamungsergebnis von Färsen und Kühen
Vet. med. Diss. Hannover
- Randy, H.A., Graf, G.C., Bibb, J. 1971
The relationsship between plasma oxytocic activity
(POA) and the reproductive status of the lactating
bovine
66th Annual-meeting of the American Dairy Science
Association, Michigan State University, East Lansing,
June 21, 1971
- Richard, Ph. 1970
An electrophysiological study in the ewe of the
tracts which transmit impulses from the mammary
glands to the pituitary stalk
J. Endocr. 47 37 - 44
- Richard, Ph. 1972
The reticulo-hypothalamic pathway controlling the
release of oxytocin in the ewe
J. Endocr. 53 71 - 83
- Richardson, K.C. 1949
Contractile tissues of the mammary gland
Proc. Roy. Soc. 136 167 - 169

- Rodbard, D., Bridson, W., Rayford, P.L. 1969
Rapid calculation of radioimmunoassay results
J. Lab. clin. Med. 74 770 - 781
- Rosa, U., Scassellati, G.A., Pennisi, F. 1964
Riccioni, N., Giagnoni, P., Giordani, R.
Labelling of human fibrinogen with ^{131}J by an
electrolytic iodination
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 86 519 - 526
- Rosenbloom, A.A., Fisher, D.A. 1974
Radioimmunoassay of arginine vasotocin
Endocrinology 95 1726 - 1732
- Roth, G.B. 1914a
Pituitary standardization. A comparison of the
physiological activity of some commercial pituitary
preparations
Hyg. Lab. Bull. 100
- Roth, G.B. 1914b
A new standard for the termination of the strength
of pituitary extracts
J. Pharmacol. exp. Ther. 5 559 - 570
- Rydén, G., Sjöholm, J. 1962
Assay of oxytocin by rat mammary gland in vitro
Brit. J. Pharmacol. 19 136 - 141
- Rydén, G., Sjöholm, J. 1969
Half-life of oxytocin in blood of pregnant and non
pregnant women
Acta Endocr. (Kbh.) 61 425 - 431

- Sachs, H., Takabatake 1964
Evidence for a precursor in vasopressin biosynthesis
Endocrinology 75 943 - 948
- Sawyer, W.H. 1961
Neurohypophysial hormones
Pharmacol. Rev. 13 225 - 277
- Seppälä, M., Aho, J., Tissari, A., Ruohslati, E. 1972
Radioimmunoassay of oxytocin in amniotic fluid,
fetal urine and meconium during late pregnancy and
delivery
Amer. J. Obstet. Gynec. 114 788 - 791
- Schams, D., Schallenberger, E. 1976
Heterologous radioimmunoassay for bovine FSH and
its application during the oestrous cycle in cattle
Acta Endocr. (Kbh.) 81 461 - 473
- Sharma, O.P. 1974
Release of oxytocin elicited by suckling stimulus
in mares
J. Reprod. Fert. 37 421 - 423
- Sharma, S.C., Fitzpatrick, R.J., Ward, W.R. 1972
Coital-induced release of oxytocin in the ram
J. Reprod. Fert. 31 488 - 489
- Sharma, O.P., Hays, R.L. 1973
Release of an oxytocic substance following genital
stimulation in bulls
J. Reprod. Fert. 35 359 - 362

- Sharma, O.P., Hays, R.L. 1976
A possible role for oxytocin in sperm transport
in the male rabbit
J. Endocr. 68 43 - 47
- Sjöholm, J., Rydén, G. 1967
Half life of oxytocin and lysin-vasopressin in blood
of rat at different hormonal stages
Acta pharmacol. Sue. 4 23 - 30
- Sjöholm, J., Rydén, G. 1969
Uptake of oxytocin in tissues after intravenous
administration of tritiated oxytocin in rats
Acta Endocr. (Kbh.) 61 432 - 440
- Skowsky, W.R., Rosenbloom, A.A., Fisher, D.A. 1974
Radioimmunoassay measurement of arginine vasopressin
in serum: development and application
J. clin. Endocr. Metab. 38 278 - 287
- Smith, M.I., McClosky, W.T. 1924a
I. Studies on the bioassay of pituitary extracts:
Concerning the use of desiccated infundibular
powder as a standard in the physiological evaluation
of pituitary extracts
Hyg. Lab. Bull. 138 1 - 36
- Smith, M.I., McClosky, W.T. 1924b
II. Some factors concerned in the deterioration of
pituitary extracts
Hyg. Lab. Bull. 138 38 - 49
- Soloff, M.W., Swartz, T.L. 1973
Characterization of a proposed oxytocin receptor
in rat mammary tissue
J. biol. Chem. 248 6471 - 6478

- Soloff, M.S., Swartz, T.L. 1974
Characterization of a proposed oxytocin receptor
in the uterus of the rat and sow
J. biol. Chem. 249 1376 - 1381
- Soloff, M.W., Swartz, T.L., Saffran, M. 1972
Specific uptake of radioactivity from ^3H -oxytocin
by surviving segments of mammary gland
Endocrinology 91 213 - 216
- Soloff, M.S., Swartz, T.L., Steinberg, A.H. 1974
Oxytocin receptors in human uterus
J. clin. Endocr. Metab. 38 1052 - 1056
- Spaeth, R.A. 1918a
Concerning a new method for the biological standardi-
zation of pituitary extract and other drugs
J. Pharmacol. exp. Ther. 11 209 - 219
- Spaeth, R.A. 1918b
The standardization of pituitary extracts
Hyg. Lab. Bull. 115
- Stehle, R.L., Fraser, A.M. 1935
The purification of pressor and oxytocic hormones
of the pituitary gland and some observations on
the chemistry of the products
J. Pharmacol. exp. Ther. 55 136 - 151
- Susak-Brzezinska, E., Golebska, M., Ewy, Z. 1965
Biological and chemical determinations of tissue
oxytocinase in cows
Acta physiol. pol. 16 151 - 158
- Thorpe, W.V. 1926
Experiments on the chemical nature of the oxytocic
principles of the pituitary gland
Biochem. J. 20 374 - 378

- Tindal, J.S., Knaggs, G.S., Turvey, A. 1969
The afferent path of the milk-ejection reflex in
the brain of the rabbit
J. Endocr. 43 663 - 671
- Tindal, J.S., Knaggs, G.S. 1970
Environmental stimuli and the mammary gland
Mem. Soc. Endocr. 18 239 - 258
- Tindal, J.S., Knaggs, G.S. 1971
Determination of the detailed hypothalamic route
of the milk ejection reflex in the guinea-pig
J. Endocr. 50 135 - 152
- Tindal, S.J., Yokoyama, A. 1962
Assay of oxytocin by the milk ejection response in
the anaesthetized lactating guinea-pig
Endocrinology 71 196 - 202
- Tuppy, H. 1953
The amino acid sequence in oxytocin
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 11 449 - 450
- Tuppy, H. 1968
The influence of enzymes on neurohypophysial hor-
mones and similar peptides
In: Handbook of experimental pharmacology XXIII
Neurohypophysial hormones and similar polypeptides
Ed. E. Berge
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York
67 - 129
- Tuppy, H., Michl, H. 1953
Über die chemische Struktur des Oxytocins
Mh. Chem. 84 1011 - 1020

- Tuppy, H., Nesvadba, H. 1957
Über die Amino-peptidaseaktivität des Schwangeren-
serums und ihre Beziehung zu dessen Vermögen,
Oxytocin zu inaktivieren.
Mh. Chem. 88 977 - 988
- Vandesande, F., Diericks, K., De May, J. 1975
Identification of the vasopressin-neurophysin II
and the oxytocin-neurophysin I producing neurons
in the bovine hypothalamus
Cell Tiss. Res. 156 189 - 200
- Du Vigneaud, V., Ressler, Ch., Tripett, S. 1953
The sequence of amino acids in oxytocin, with a
proposal for the structure of oxytocin
J. biol. Chem. 205 949 - 957
- Du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J.M., Roberts, W.,
Katsoyannis, P.G. 1954
The synthesis of oxytocin
J. Amer. chem. Soc. 76 3115 - 3121
- Voglmayr, J.K. 1975
Output of spermatozoa and fluid by the testis of
the ram and its response to oxytocin
J. Reprod. Fert. 43 119 - 122
- Vorherr, H., Kleemann, C.R., Lehrmann, E. 1967
Oxytocin-induced stretch reaction in suckling mice
and rats: a semiquantitative bio-assay for oxytocin
Endocrinology 81 711 - 715
- Wakerly, J.B., Dyball, R.E.J., Lincoln, P.W. 1973
Milk ejection in the rat: the result of a selective
release of oxytocin
J. Endocr. 57 557 - 558

- Walter, R., Shlank, H. 1975
Differences in the enzymatic inactivation of arg.
vasopressin and oxytocin by rat kidney homogenate
Endocrinology 96 811 - 814
- Walter, R., Schlesinger, D., Schwartz, I.L.,
Capra, J.D. 1971
Complete amino acid sequence of bovine neuro-
physine II
Biochem. biophys. Res. Commun. 44 293 - 298
- Watkins, W.B. 1973
The isolation and biochemical characterization of
three neurophysins of the sheep
J. Endocr. 59 17 - 29
- Watkins, W.B., Ellis, H.K. 1973
The designation of the major guinea-pig neural
lobe protein as a neurophysin
J. Endocr. 59 31 - 41
- Weiß, P. 1961
The concept of perpetual neuronal growth and proximo-
distal substance convection
In: Regional neurochemistry; Eds Kety S.E. and
Elkes J.
Oxford, Pergamon Press 220 - 242
- Werle, E. und Effkemann, G. 1941
Über die oxytocinabbauende Fähigkeit des Schwange-
renblutes
Arch. Gynäk. 171 286 - 290

- Winkhaus, B. 1954
Oxytocinase-Bestimmung bei Kühen unter Berücksichtigung der Bedeutung des Hormons Oxytocin bei der Milchentleerung und Geburtsauslösung
Vet. Med. Diss. München
- Yalow, R.S., Berson, B.A. 1960
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
J. clin. Invest. 39 1157 - 1175
- Yman, L., Sjöholm, R. 1967
Some physico-chemical properties of oxytocinase (cystineaminopeptidase)
Acta pharmacol. Sue. 4 13 - 22

Herrn Prof. Dr. Heinrich Karg möchte ich für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftlichen Anregungen sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten im Institut meinen besonderen Dank sagen.

Ebenso danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Dieter Schams für die methodische Einarbeitung und die zahlreichen Ratschläge und die Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Mary L. Forsling, London, die mir in zahlreichen Gesprächen wertvolle Ratschläge gab und auch bei der praktischen Einarbeitung behilflich war.

Die Arbeit wurde dankenswerterweise mit Mitteln aus dem Sonderforschungsbereich 141 (Technik der Rinderhaltung) unterstützt.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Mitarbeitern im Labor für alle größeren und kleineren Hilfestellungen, gleiches gilt für die Mitarbeiter auf der Versuchsstation Veitshof der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt Weihenstephan.

L e b e n s l a u f

Volker Himmler	15.02.44	geboren in Nordrach/Kreis Wolfach
Schulbesuch	1950-1954	Volksschule
	1954-1964	Neusprachliches Gymnasium (Wittelsbacher Gymnasium München)
Studium	1966-1967	Pädagogische Hochschule
	1967-1972	Tiermedizin
Approbation	1972	November
Beruf	1964-1966	Bundeswehr
	1972-1973	Stipendiat nach dem Graduiertenförderungsgesetz an der Tierärztlichen Fakultät an der Universität München. Während dieser Zeit im Institut für Physiologie der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan der TU-München tätig.
	1973-1976	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Physiologie in Weihenstephan
	seit 01.09.76	Wissenschaftlicher Assistent an der Tierärztlichen Hochschule Hannover am Physiologischen Institut
Familienstand	seit 1966	verheiratet, 1 Kind

